



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z VYBRANÝCH ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM SELECTED WASTE SUBSTRATES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

TERÉZIA DINGOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0865/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Terézia Dingová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Produkce polyhydroxyalkanoátů z vybraných odpadních substrátů

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše k dané problematice
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod
3. Experimentální studie
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Terézia Dingová
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca sa zameriava na štúdium produkcie polyhydroxyalkanoátov (PHA) baktériami *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* a taktiež faktorov, ktoré produkciu ovplyvňujú. Hlavnou skúmanou oblasťou bola produkcia PHA na substráte z kukuričnej siláže. V teoretickej časti bola podaná stručná charakteristika PHA, ako aj možnosti ich využitia v praxi a možnosti ich bakteriálnej produkcie kultiváciou na odpadných substrátoch. V experimentálnej časti práce bol sledovaný vplyv prekursorov pridaných do média na nárast biomasy, produkciu PHA a inkorporáciu monoméru 3HV do polymérneho reťazca. Ďalej bola optimalizovaná metóda hydrolýzy kukuričného materiálu a na hydrolyzátach boli kultivované baktérie. Pri kultivácii na hydrolyzátach z kukuričného odpadu boli dosiahnuté najlepšie výsledky s použitím hydrolyzátu pripraveného kombináciou chemickej a enzymatickej hydrolýzy. Kultivácie oboch baktérii boli prevedené aj do laboratórneho bioreaktoru.

ABSTRACT

This bachelor's thesis is focused on study of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by bacterial strains *Burkholderia sacchari* and *Burkholderia cepacia*. It also deals with influence of various factors on their production. The main studied area was PHA production from substrate prepared from corn stover. In theoretical part a brief description of PHA was given. We also summarized options on their practical applications and possibilities of their bacterial production from waste substrates. In experimental part of work the impact of used precursors on biomass growth, PHA production and incorporation of 3HV monomer into the polymer chain was monitored. Further, a method of corn material hydrolysis was optimized. Bacterial cultures were cultivated on prepared hydrolysates. The best results in cultivation on hydrolysates of corn silage were achieved when the hydrolysis was performed by combination of chemical and enzymatic way. Cultivations of both bacteria were also transferred into the laboratory bioreactor.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), Polyhydroxybutyrát (PHB), *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia*, kukuričná siláž

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoate (PHA), Polyhydroxybutyrate (PHB), *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia*, corn stover

DINGOVÁ, T. *Produkce polyhydroxyalkanoátů z vybraných odpadních substrátů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalárskou prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Podakovanie:

Moje podakovanie patrí vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za cenné rady a ochotnú pomoc v laboratóriu aj pri vypracovávaní samotnej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	7
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	7
2.1.1	Fyzikálno-chemické vlastnosti PHA	8
2.1.2	Biosyntéza	10
2.1.3	Biodegradácia	13
2.1.4	Využitie polyhydroxyalkanoátov	14
2.1.5	Možnosti zníženia produkčných nákladov	14
2.2	Využitie odpadných substrátov k produkcii PHA	15
2.2.1	Kukuričná siláž ako odpadný substrát	15
2.2.2	Celulóza	15
2.2.3	Hydrolýza celulózy	16
2.3	Bakteriálne kmene využívané na produkciu PHA	17
2.3.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	18
2.3.2	<i>Burkholderia sacchari</i>	19
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie, materiál a prístroje	21
3.1.1	Bakteriálne kmene	21
3.1.2	Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov	21
3.1.3	Prístroje.....	21
3.2	Kultivácia baktérií <i>Burkholderia cepacia</i> a <i>Burkholderia sacchari</i>	21
3.2.1	Uchovávanie kultúry a príprava inokula:	21
3.2.2	Živné média	22
3.3	Stanovenie biomasy	22
3.3.1	Stanovenie kalibračnej priamky	22
3.4	Stanovenie koncentrácie PHA	23
3.4.1	Stanovenie kalibračnej priamky	23
3.5	Stanovenie glukózy	23
3.5.1	Stanovenie kalibračnej priamky	23
3.6	Stanovenie nevyužitých prekursorov	23
3.7	Štúdium vplyvu typu prekursoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine.....	24

3.8	Štúdium vplyvu koncentrácie prekurzoru a času pridania prekurzoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine.....	24
3.9	Štúdium produkcie PHA z kukuričného odpadu	24
3.9.1	Stanovenie celulózy	24
3.9.2	Štúdium vplyvu typu hydrolýzy kukuričnej siláže na produkciu PHA	24
3.9.3	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzáta na produkciu PHA	25
3.9.4	Kultivácia baktérie <i>Burkholderia cepacia</i> na hydrolyzáte kukuričnej siláže .	25
3.9.5	Kultivácia baktérie <i>Burkholderia sacchari</i> na hydrolyzáte kukuričnej siláže	26
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	27
4.1	Kalibračné priamky	27
4.1.1	Stanovenie koncentrácie biomasy	27
4.1.2	Stanovenie PHA	28
4.1.3	Stanovenie glukózy.....	29
4.2	Štúdium vplyvu typu prekurzoru na nárast biomasy a podiel PHA.....	29
4.3	Štúdium vplyvu koncentrácie prekurzoru a času pridania prekurzoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine.....	33
4.4	Štúdium produkcie PHA z kukuričného odpadu	35
4.4.1	Stanovenie celulózy	35
4.4.2	Štúdium vplyvu typu hydrolýzy kukuričnej siláže na produkciu PHA	35
4.4.3	Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzáta na produkciu PHA	38
4.4.4	Kultivácia baktérie <i>Burkholderia cepacia</i> na hydrolyzáte kukuričnej siláže v laboratórnom bioreaktore	40
4.4.5	Kultivácia baktérie <i>Burkholderia sacchari</i> na hydrolyzáte kukuričnej siláže v laboratórnom bioreaktore	42
5	ZÁVER.....	44
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	45
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	48

1 ÚVOD

Syntetické plasty sú v dnešnej dobe neodmysliteľnou súčasťou našich životov. Vďaka ich vyhovujúcim fyzikálno-chemickým vlastnostiam a dobrej cenovej dostupnosti sa stali obľúbenými náhradami za materiály ako drevo, sklo, kov a iné. Oblasť využitia plastov je veľmi široká, sú z nich vyrábané predmety každodenného použitia, tvoria taktiež podstatnú časť obalových materiálov.

Vysoká stálosť syntetických polymérov zabezpečená chemickou štruktúrou však na druhej strane znemožňuje ich jednoduchú likvidáciu. Doba ich rozkladu sa pohybuje v desiatkach až stovkách rokov, čo pri množstve vyrábaných produktov predstavuje závažný problém pre životné prostredie. Ekologicky výrazne nepriaznivé je aj riešenie likvidácie plastov spaľovaním, pretože pri ňom dochádza k uvoľňovaniu toxických látok (napr. dioxínov s karcinogénnymi účinkami) do ovzdušia.

Kvôli zmieneným problémom vyvstávajúcich z neustále narastajúceho dopytu po plastoch sa stalo dôležitou témou výskumu hľadanie nových materiálov s vlastnosťami podobnými plastom syntetickým, avšak jednoducho rozložiteľných a nezaťažujúcich tak životné prostredie.

Takúto alternatívu ponúkajú napríklad organické biopolyméry polyhydroxyalkanoáty, produkované radou baktérií ako zásobné látky. Vlastnosti týchto látok sú veľmi podobné plastom ako polyetylén či polypropylén a majú tak široké možnosti uplatnenia. Jednou z výhod oproti syntetickým plastom je, že nie sú vyrábané z neobnoviteľných zdrojov. Hlavným faktorom vyzdvihujúcim ich využitie je však významná schopnosť biodegradácie. Vo vhodných podmienkach (za prítomnosti potrebných mikroorganizmov) sa dokážu v prírodnom prostredí rozložiť v priebehu niekoľkých týždňov až mesiacov. Ich produkcia je navyše možná s využitím rôznych odpadných substrátov, napr. z odpadných vôd, odpadov vznikajúcich v poľnohospodárskom priemysle či z potravinárskej výroby.

Využívanie odpadných substrátov zároveň znižuje produkčnú cenu bioplastov, ktorá je doposiaľ prekážkou v ich širšom uplatnení. Je totiž približne päťnásobne vyššia ako výrobná cena syntetických plastov. Z tohto dôvodu je nevyhnutné nachádzanie najefektívnejších spôsobov výroby polyhydroxyalkanoátov a tým zníženie nákladov na ich výrobu.

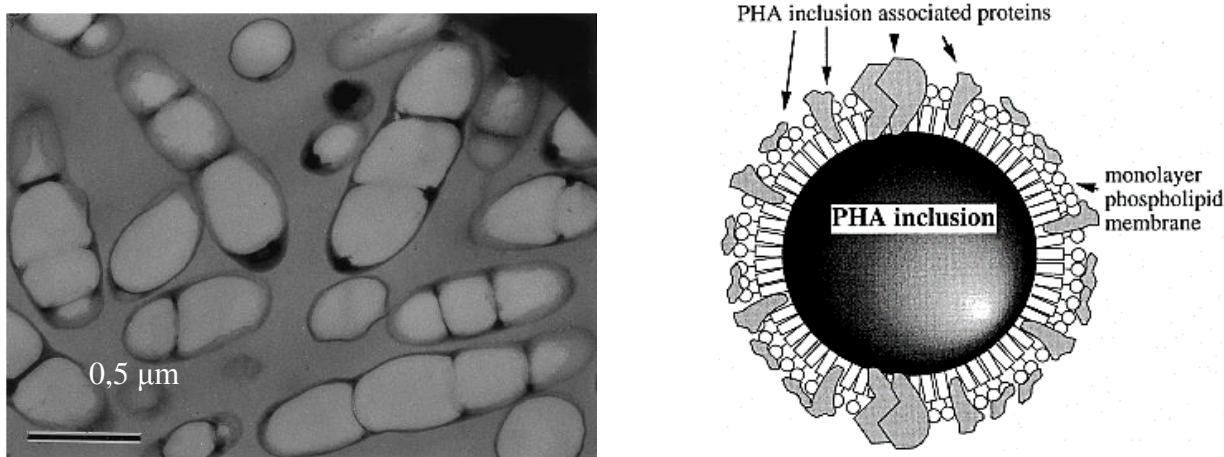
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú skupina opticky aktívnych biologických polyesterov obsahujúcich monomérmne jednotky (*R*)-3-hydroxyalkánových kyselín [1]. Ich vlastnosti sú veľmi blízke vlastnostiam syntetických plastov, ako napríklad polyetylén, polypropylén a iné. Ich prednosťou oproti komerčne využívaným plastom je biodegradabilita a biokompatibilita [2]. Sú to jediné bioplasty kompletne syntetizované mikroorganizmami [3].

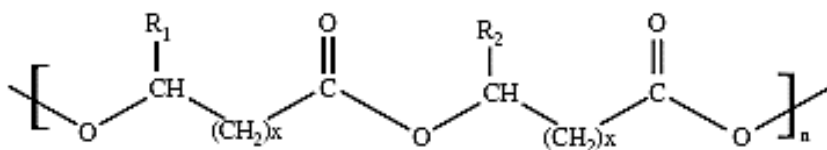
Niektoré baktérie sú schopné syntetizovať PHA ako zásobu uhlíka a energie. Deje sa to všeobecne ako odpoveď na stres, alebo v prípade dostupnosti nadbytku zdroja uhlíka v situácii, keď je rast obmedzený nedostatkom niektorej z esenciálnych živín, ako napríklad dusík, kyslík, fosfor alebo horčík [4].

Polyhydroxyalkanoáty sa akumulujú v cytoplazme baktérií vo forme inklúzií s priemerom 0,2 – 0,5 µm. Prirodzené inklúzie PHA je možné nafarbiť farbivom sudanová čierna B, čo indikuje ich lipofilnú povahu. Na povrchu inklúzií v bunkách sú lokalizované proteíny spojené s biosyntézou PHA (PHA polymeráza), alebo ich degradáciou a mobilizáciou (intracelulárna PHA depolymeráza).

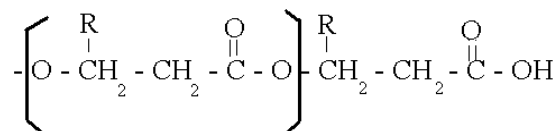


Obrázok 1: Inklúzie PHA v bunke (vľavo), schematické znázornenie inklúzie (vpravo) [1]

Najčastejšie sa vyskytujúci PHA je poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB) [1]. V posledných rokoch bolo zaznamenaných okolo 150 monomérov okrem 3HB ako stavebných jednotiek bakteriálnych PHA. Tieto monoméry sú zabudované do polyesterového reťazca spolu s 3-hydroxybutánovou kyselinou a vytvárajú náhodné kopolyméry alebo zmesi polyesterov [5]. Medzi najbežnejšie monoméry PHA patria 3-hydroxyvalerát, 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyoktanoát, 3-hydroxydekanoát a 4-hydroxybutyrát [6].



Obrázok 2: Všeobecná štruktúra PHA [7]



Obrázok 3: Štruktúra polyhydroxybutyrátu ($R = \text{CH}_3$) a polyhydroxyvalerátu ($R = \text{CH}_2\text{-CH}_3$) [8]

Podľa počtu uhlíkových atómov v monoménej jednotke možno PHA rozdeliť do dvoch skupín: scl (short-chain-length) pozostávajúce z 3 – 5 uhlíkových atómov, a mcl (medium-chain-length), ktoré sú tvorené 6 – 14 atómami uhlíka [9].

Zatiaľ čo scl PHA vďaka relatívne vysokému podielu kryštalických štruktúr vykazujú skôr termoplastické vlastnosti, mcl PHA disponujú minimálnou kryštalickosťou, sú amorfné a majú elastické a adhezívne vlastnosti [10].

2.1.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti PHA

Bohaté vlastnosti PHA závisia na ich štruktúre [3]. Tieto polyestery majú izotaktickú štruktúru – všetky sa vyskytujú v (R)-konfigurácii. Je to spôsobené stereošpecifitou enzýmov biosyntézy [9]. Molekulové hmotnosti PHA sa pohybujú v rozsahu $1 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^6$, v závislosti na konkrétnom PHA, na mikroorganizme a jeho rastových podmienkach. Polyhydroxyalkanoáty je možné označiť za termoplasty, keďže ich teploty topenia sa nachádzajú v oblasti 50 – 180 °C [1,9].

2.1.1.1 Poly(3-hydroxybutyrát)

Najznámejší polyhydroxyalkanoát – P(3HB) sa nenachádza len v mikroorganizmoch ako zásobná látka, ale je pomerne rozšírený v celej prírode. Nízkomolekulárne oligoméry (120 – 200 monomérnych jednotiek) boli nájdené aj v rastlinných, živočíšnych a dokonca ľudských telách. Vo viacerých prípadoch bola táto forma PHB objavená v bunkových membránach ako komplex s polyfosfátmi, slúžiaci zrejme ako iónový prenášač [9].

P(3HB) izolovaný z baktérií disponuje 50–80% kryštalickosťou, kým jeho inklúzie vnútri buniek vykazujú amorfný charakter a sú nerozpustné vo vode [1]. Teplota skleného prechodu P(3HB) leží v rozmedzí 4 – 9 °C a teplota topenia je 173 – 180 °C. Polymér sa rozkladá pri teplote okolo 200 °C, čo je blízko teploty topenia. V pevnom, kryštalickom stave tvorí pravotočivý hélix a táto konformácia zostáva zachovaná aj v roztoku chloroformu [9]. Hustota kryštalického P(3HB) je $1,26 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, v amorfnom stave $1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Mechanické vlastnosti sú veľmi podobné izotaktickému polypropylénu: Youngov modul 3,5 GPa a pevnosť v ťahu 43 MPa. Podstatne nižšia je však rozťažnosť, ktorá je u homopolyméru P(3HB) len okolo 3 %. Rozťažnosť polypropylénu je 400 % [1,9].

2.1.1.2 Kopolyméry PHA

V závislosti na druhu baktérie a rastových podmienkach môžu byť produkované homopolyméry alebo kopolyméry PHA. Prvým objaveným homopolymérom PHA bol P(3HB) [3]. Čistý homopolymér P(3HB) je však krehký a málo elastický, čo obmedzuje jeho využitie. Z tohto dôvodu sa výskum aktuálne zaujíma o produkciu kopolymérov PHA.

Fyzikálne a termálne vlastnosti kopolymérov PHA sa líšia s ich molekulovými hmotnosťami a zastúpením jednotlivých monomérov v molekule PHA. Zabudovanie iných monomérnych jednotiek do reťazca P(3HB) výrazne zlepšuje jeho mechanické vlastnosti. Je tak možné získať

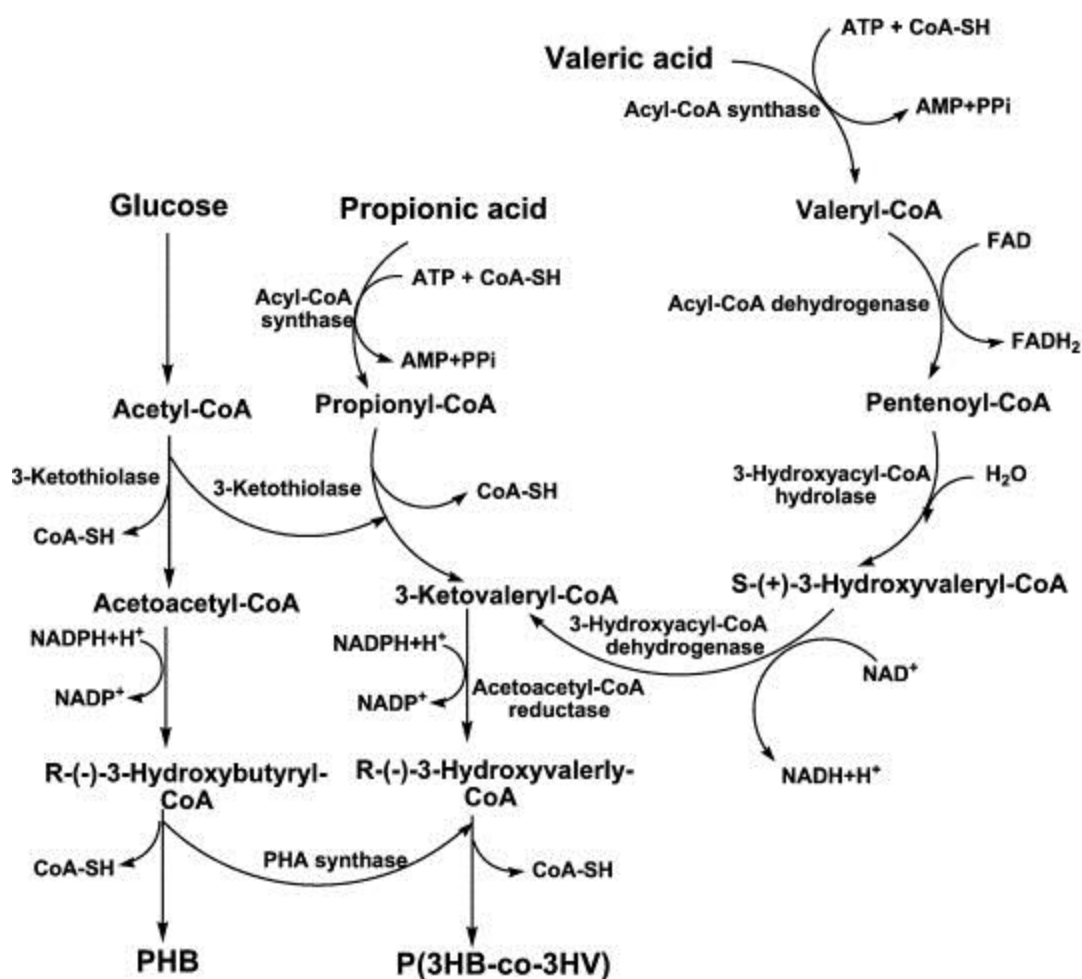
široký výber polyesterov s rozličnými vlastnosťami, od vysoko kryštalických plastov až po elastické gumi.

Kopolymér P(3HB-*co*-3HV) má v porovnaní s PHB dve veľké výhody: nižšiu teplotu topenia a úroveň kryštalickosti. Fyzikálne vlastnosti kopolyméru závisia na zastúpení 3HV v molekule. Pri vyšších podieloch 3HV je jemnejší a elastickejší [11].

Zabudovanie inej hydroxyalkánovej kyseliny do reťazca polyméru závisí na dostupnom uhlíkovom zdroji. Bakteriálna produkcia P(3HB-*co*-3HV) je založená na prídavku kyseliny propiónovej k uhlíkovému zdroju ako prekurzoru 3HV [12].

Tabuľka 1: Porovnanie fyzikálnych vlastností vybraných PHA s polypropylénom [24,25]

polymér	teplota topenia [°C]	pevnosť v ťahu [Mpa]	Youngov modul [Gpa]	roztlačnosť [%]
P(3HB)	179	40	3,5	3
P(3HB- <i>co</i> -3HV) 90:10	150	25	1,2	20
P(3HB- <i>co</i> -3HV) 80:20	135	20	0,8	100
P(4HB)	53	104	149	1000
P(3HB- <i>co</i> -4HB) 90:10	159	24	-	242
P(3HB- <i>co</i> -4HB) 10:90	50	65	100	1080
PP	170	34,5	1,7	400



Obrázok 4: Navrhovaná dráha biosyntézy P(3HB) a P(3HB-co-3HV) [28,29,30]

2.1.2 Biosyntéza

PHA môžu byť syntetizované chemickým spôsobom alebo biologickou cestou. Biosyntéza PHA vedie k výrazne vyšším molekulovým hmotnostiam v porovnaní s chemickými metódami [3]. K syntéze PHA v mikroorganizmoch dochádza obvykle vtedy, keď sa nachádzajú v nadbytku uhlíkového zdroja a zároveň v nedostatku iných esenciálnych živín. Množstvo a veľkosť granúl PHA závisí na druhu mikroorganizmu a jeho fáze rastu. Jednotlivé granule sú obalené fosfolipidovou vrstvou, v ktorej sú ukotvené proteíny spojené s metabolizmom PHA (PHA syntázy, depolymerázy, štruktúrne proteíny a regulačné proteíny) [2].

Acetyl-CoA je kľúčovým komponentom v dodávaní 3-hydroxyalkanoyl-CoA ako substrátu pre PHA syntázy. 3-hydroxyalkanoyl-CoA môže byť dodávaný taktiež z β -oxidácie mastných kyselín o rôznych dĺžkach reťazca [3].

V syntéze PHA je priamo alebo nepriamo začlenených mnoho génov kódujúcich rôzne enzýmy. Zatiaľ je známych osem metabolických dráh biosyntézy PHA.

Prvá dráha zahŕňa tri kľúčové enzýmy: β -ketothiolázu, NADPH-dependentnú acetyl-CoA reduktázu a PHA syntázu kódované génmi *phaA*, *phaB* a *phaC*. Pridružená dráha zahŕňajúca degradáciu PHA katalyzovanú PHA depolymerázou, dimér hydrolázou, 3-hydroxybutyrát dehydrogenázou a acetoacetyl-CoA syntázou pomáha regulovať syntézu a degradáciu PHA.

Druhá dráha syntézy PHA je spájaná s príjmom mastných kyselín mikroorganizmami. Po β -oxidácii mastných kyselín acetyl-CoA vstupuje do procesu syntézy monomérov PHA. V zásobovaní syntézy prekurzorom 3-hydroxyacyl-CoA sú zapojené enzýmy vrátane 3-ketoacyl-CoA reduktázy, epimerázy, (R)-enoyl-CoA hydratázy/enoyl-CoA hydratázy I a acyl-CoA oxidázy.

Dráha III zahŕňa 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferázu a malonyl-CoA-ACP transacylázu, ktoré dodávajú 3-hydroxyacyl-ACP, z ktorého je formovaný monomér PHA 3-hydroxyacyl-CoA.

V *štvrtnej dráhe* je využívaná NADH-dependentná acetoacetyl-CoA reduktáza k oxidácii (S)-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA.

Piata dráha využíva sukcinyl semialdehyd dehydrogenázu, 4-hydroxybutyrát dehydrogenázu a 4-hydroxybutyrát-CoA:CoA transferázu k syntéze 4-hydroxybutyryl-CoA, z ktorého vzniká PHA obsahujúci 4-hydroxybutyrát.

Šiesta dráha údajne obsahuje laktonázu a hydroxyacyl-CoA syntázu, ktoré katalyzujú vznik 4,5-hydroxyacyl-CoA z 4,5-alkánolaktónu.

V *dráhe VII* je 1,4-butándiol oxidovaný na 4-hydroxybutyrát, potom na 4-hydroxybutyryl-CoA, z ktorého vzniká PHA obsahujúci 4-hydroxybutyrát.

V *ôsmej dráhe* je 6-hydroxyhexanoát prevádzaný na PHA obsahujúci 6-hydroxyhexanoát, a to pôsobením ôsmich enzýmov [3].

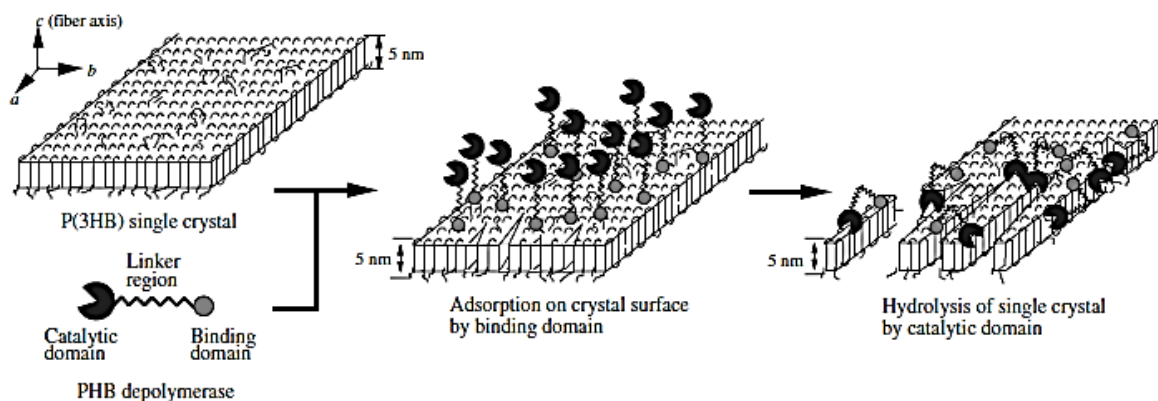
2.1.3 Biodegradácia

Polyhydroxyalkanoáty môžu degradovať intracelulárne pôsobením intracelulárnych depolymeráz, za účelom dodania naakumulovaného uhlíka a energie v prípade absencie vhodných vonkajších zdrojov. Degradácia sa môže uskutočňovať aj extracelulárne, extracelulárnymi depolymerázami, pri spotrebovávaní monomérov alebo oligomérov plesňami, kvasinkami a baktériami. Táto degradácia sa vyskytuje vo veľkom množstve komplexných ekosystémov, vrátane prostredí s dobrým aj slabým prístupom kyslíka, ako napríklad pôda, morská voda či kal. Medzi faktory ovplyvňujúce proces degradácie patria mikrobiologické parametre daného ekosystému, ako hustota populácie, mikrobiálna diverzita a aktivita a priestorová distribúcia mikroorganizmov. Ďalšími faktormi sú fyzikálno-chemické aspekty prostredia, konkrétne teplota, hodnota pH, vlhkosť, množstvo kyslíka, redoxný potenciál alebo zásoba živín. Rozhodujúce sú aj vlastnosti samotných polymérov, predovšetkým ich stereoregularita, kryštalickosť, molekulová hmotnosť a monomérové zloženie polyméru [9]. Extracelulárne PHA-degradujúce enzýmy, produkované mikroorganizmami, hydrolyzujú pevné PHA na monoméry a oligoméry rozpustné vo vode. Tieto následne využívajú ako živiny [1].

2.1.3.1 Extracelulárne PHB depolymerázy

Extracelulárne PHB depolymerázy boli purifikované z množstva mikroorganizmov a následne charakterizované. Takéto PHB depolymerázy pozostávajú z jedného polypeptidového reťazca a ich molekulové hmotnosti sa pohybujú v rozmedzí 37 000 – 60 000. Analýza štruktúrnych génov pre PHB depolymerázy ukázala, že všetky pozostávajú z katalytickej a väzbovej domény prepojených spojovacou oblasťou. [1]

Enzymatickou hydrolýzou P(3HB) PHB depolymerázou vznikajú ako hlavný produkt diméry PHB a menšie množstvo PHB monomérov. Enzým štiepi prednostne druhú a tretiu esterovú väzbu od hydroxylového konca [13]. Rýchlosť enzymatického rozkladu P(3HB) je silne závislá na koncentrácii PHB depolymerázy. Pevný polymér P(3HB) predstavuje vo vode nerozpustný substrát, kým PHB depolymerázy sú vo vode rozpustné. Degradácia P(3HB) je teda heterogénna reakcia zahŕňajúca dva kroky: adsorpciu a hydrolýzu. V prvom kroku enzým adsorbuje na povrch poly(3-hydroxybutyrátu) väzbovou doménou a v druhom kroku dochádza k hydrolýze polymérnych reťazcov aktívnym miestom enzýmu [14].



Obrázok 6: Schematický model hydrolýzy kryštálu P(3HB) PHB depolymerázou [1]

2.1.4 Využitie polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty predstavujú jedinečnú kombináciu vlastností. Predovšetkým, PHA majú oproti syntetickým polymérom základnú výhodu v tom, že pochádzajú z obnoviteľných zdrojov, a nie sú závislé na zásobách ropy. Ďalšia veľká výhoda spočíva v ich biodegradabilite, teda že môžu byť kompletne rozložené na neškodné základné molekuly, prirodzene sa vyskytujúce v prírode. Napriek tomu, že je jednoduché dosiahnuť degradáciu, ich skladovateľnosť je teoreticky neobmedzená. K rozloženiu totiž potrebujú prostredie s dostatočným zastúpením mikroorganizmov využívajúcich PHA. Nemenej dôležitou vlastnosťou týchto polymérov je ich hydrofóbnosť, čím je zaručená odolnosť voči vlhkosti [9].

Bioplasty na báze bakteriálnych polyhydroxyalkanoátov nachádzajú potenciálne využitie ako obalové materiály, spotrebná elektronika, medicínske materiály, ďalej využitie v gastronómickom priemysle, v poľnohospodárstve a záhradníctve, na výrobu hračiek, textílií a iné [15].

Prvým komerčným využitím P(3HB) alebo P(3HB-co-3HV) bolo balenie hygienických produktov, napríklad šampónové fľašky. Nasledovali ďalšie obalové výrobky, nádoby, tuby, tašky či jednorazové žiletky. Medzi funkčne využiteľné predmety možno zaradiť vrecia na odpady, ktoré je možné kompostovať spolu s ich obsahom, rybárske siete, poľnohospodárske zariadenia na dodávku živín, hnojív, pesticídov a insekticídov [9].

Bývalá aj terajšia priemyselná produkcia bioplastov pozostávajúcich z PHA je zameraná najmä na medicínske aplikácie, ako napríklad kožné náhrady, srdcové chlopne, cievne a kostné transplantáty a mikročastice určené na doručenie liečiv. Je tomu tak vďaka biokompatibilite a biodegradabilite PHA [15].

2.1.5 Možnosti zníženia produkčných nákladov

Trh s polyhydroxyalkanoátmi je napriek všetkým výhodám stále veľmi obmedzený. Príčinou je vysoká cena bakteriálnej fermentácie, čo robí PHA 5–10 krát drahšie ako plasty na báze ropy. Trvajúca dostupnosť veľkého množstva ropy má za následok, že jej cena v blízkej budúcnosti nebude dramaticky rásť. Z týchto dôvodov sa v súčasnej dobe vyvíjajú stratégie k zníženiu nákladov pri výrobe PHA [6].

Náklady na výrobu PHA klasickým fermentačným procesom je možné rozdeliť medzi cenu substrátu, prevádzkové výdaje a cenu separácie PHA z mikrobiálnej biomasy [9].

Aby mohla byť dosiahnutá vysoká finálna koncentrácia produktu, je potrebné získať čo najvyššiu hustotu biomasy pri fermentácii. Čo najvyššia musí byť aj akumulácia PHA v sušine biomasy, ideálne nad 90-95 %. Tým by bolo možné vyhnúť sa drahej a komplikovanej purifikácii výsledného produktu, pretože vysoký stupeň akumulácie PHA v bunkách môže viesť k ich narušeniu, a to uľahčuje proces lýzy buniek. K dosiahnutiu vysokých podielov PHA v biomase je nevyhnutné zvládnuť manipulácie s mechanizmom syntézy PHA.

Granule PHA by mali byť veľké kvôli jednoduchšej separácii. Veľkosť je možné zvýšiť manipuláciou s proteínmi asociovanými s tvorbou granúl.

Keďže najdôležitejšiu úlohu v cene PHA zohráva substrát, na ktorom sú mikroorganizmy kultivované (približne 60 %), rozhodujúce je využívať nízkonákladové substráty, a zároveň dosiahnuť vysokú efektivitu v konverzii substrátu na PHA. Riešením by mohlo byť odstránenie metabolických dráh využívajúcich substrát k iným účelom ako k tvorbe PHA.

Spomenuté ciele je možné dosiahnuť metódami genetického inžinierstva, syntetickej biológie, či úpravami metabolických dráh [6].

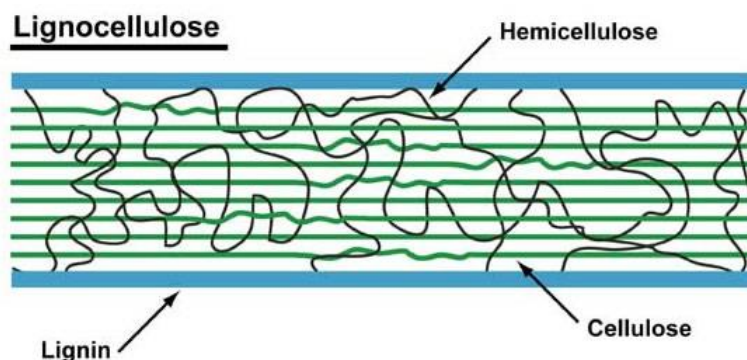
2.2 Využitie odpadných substrátov k produkcii PHA

O priemyselnú produkciu PHA prostredníctvom mikroorganizmov je vedené množstvo pokusov, ale stále je tu potreba prekonať problém ich vysokých produkčných nákladov, aby mohli cenovo súperiť s konvenčnými plastami. Medzi súčasné prístupy k zníženiu produkčných nákladov patrí hľadanie nových kmeňov schopných syntetizovať biopolyméry s vyššou produktivitou, alebo nahradenie uhlíkového zdroja lacnejším. Dostupným riešením je zatiaľ využitie substrátov ako melasa, škrob, srvátka z mliekarenského priemyslu, odpadná voda z výroby olivového oleja, xylóza a široká škála rastlinných olejov [16].

2.2.1 Kukuričná siláž ako odpadný substrát

Materiály na báze celulózy, medzi ktoré patria aj poľnohospodárske odpady ako obilná a kukuričná slama, či kukuričné oklasky, predstavujú perspektívnu surovinu pre biotechnologickú výrobu. Vzhľadom k tomu, že sa z veľkej časti jedná buď o odpadné materiály alebo časti rastlín, ktoré nemajú potravinárske využitie, ich zdroje sú obnoviteľné a ich cena je v porovnaní s poľnohospodárskymi surovinami veľmi nízka, mohli by predstavovať ideálnu surovinu pre nadväzujúci biotechnologický proces [17].

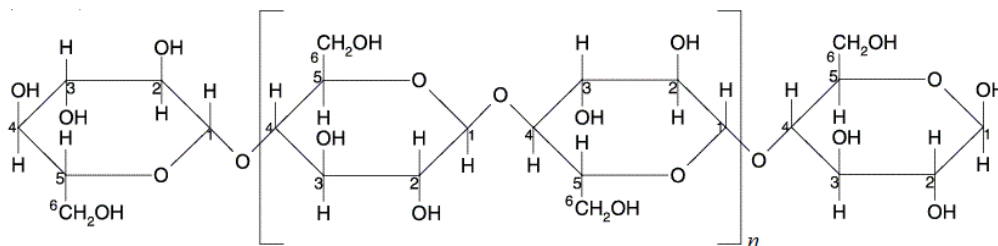
Kukuričná siláž sa skladá z približne 41,7 % celulózy, 20 % hemicelulóz a 17 % lignínu [18].



Obrázok 7: Znázornenie usporiadania hlavných zložiek lignocelulózového materiálu [19]

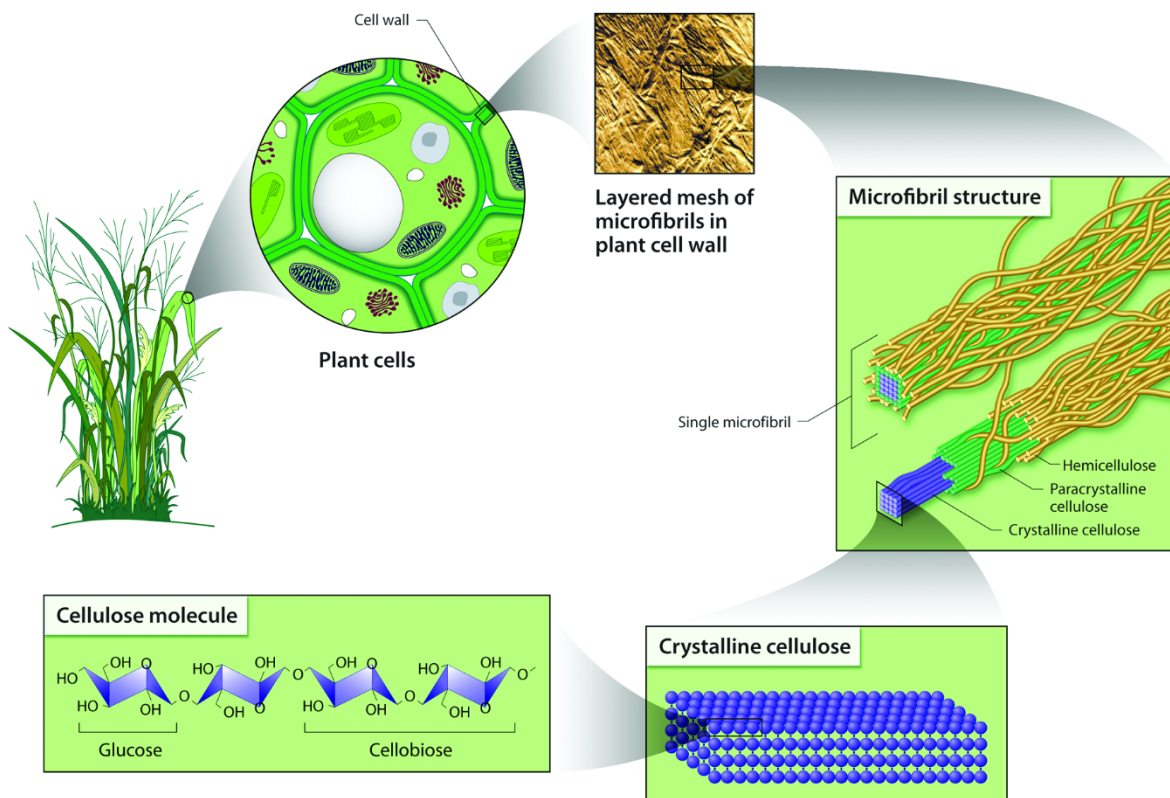
2.2.2 Celulóza

Celulóza je organická makromolekula so všeobecným vzorcom $(C_6H_{10}O_5)_n$, kde n predstavuje stovky až desaťtisíce monomérnych jednotiek. Je to kryštalický polysacharid pozostávajúci z β -D-glukopyranózových jednotiek viazanými β -1,4-glykozidovými väzbami do lineárnych reťazcov [20]. V rastlinnom materiáli sa vyskytuje prevažne v kryštalickej a v menšej miere i amorfnej forme.



Obrázok 8: Štruktúra celulózy [21]

Jednotlivé celulóзовé vlákna sú v bunkových stenách rastlín organizované do fibríl, spevnené vodíkovými väzbami a asociované s ďalšími ochrannými polymérnymi štruktúrami, ktoré sú tvorené najmä lignínom a hemicelulózou [22]. Hemicelulóza sprostredkováva spojenie medzi celulóзовými vláknami a lignínom a je zložená prevažne z pentóz, hexóz a uronových kyselín, pričom prevažujúcou zložkou sú xylány a glukomanány [23]. Aby bolo možné tento materiál využiť pre mikrobiálnu výrobu, je nutné túto komplexnú maticu narušiť a upraviť tak, aby boli získané fermentovateľné cukry, ktoré môžu byť mikroorganizmami využité pre rast a produkciu metabolitov [17].



Obrázok 9: Postavenie celulózy v rastlinnej bunke [24]

2.2.3 Hydrolýza celulózy

Konverzia lignocelulóзовej biomasy na cukry využiteľné mikroorganizmami môže byť realizovaná chemickým spôsobom za využitia minerálnej kyseliny (H_2SO_4), alebo biologickou cestou s využitím enzýmov [25].

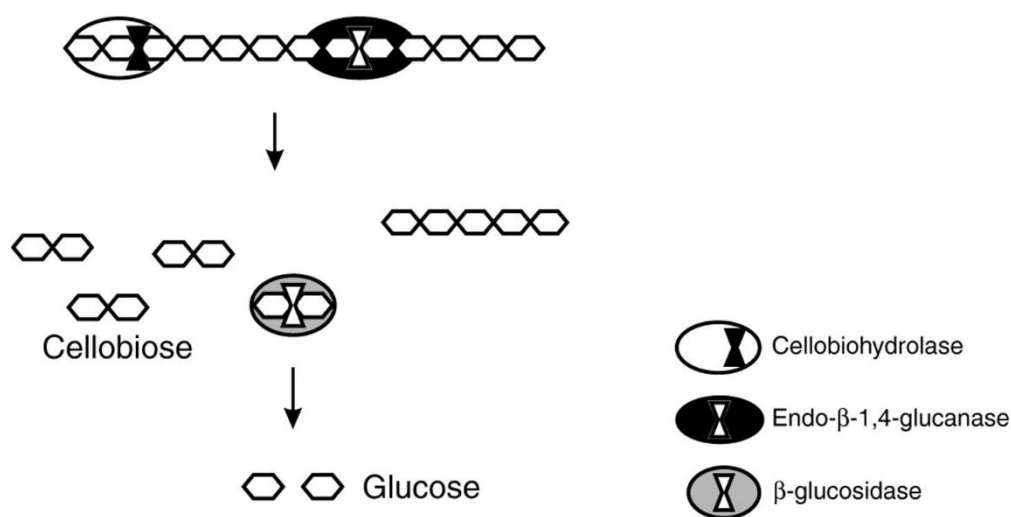
2.2.3.1 Chemická hydrolýza zriedenou kyselinou

Štiepenie β -1,4-glykozidových väzieb kyselinami vedie k hydrolýze celulóзовých polymérov za vzniku molekúl glukózy alebo oligosacharidov. Na hydrolýzu celulózy sa používajú minerálne kyseliny ako HCl a H₂SO₄. Lignocelulóзовé materiály obvykle vyžadujú predúpravu kvôli asociácii troch hlavných zložiek rastlinných bunkových stien – celulózy, hemicelulózy a lignínu. Hemicelulóza predstavuje určitú bariéru v enzymatickom rozklade celulózy. Bolo zistené, že po odstránení hemicelulózy prebieha štiepenie celulózy enzýmami výrazne efektívnejšie. Na tento účel je najvhodnejšia zriedená kyselina sírová, pretože vykazuje vysokú efektivitu v separačnom procese komponentov bunkových membrán [26,27].

2.2.3.2 Enzymatická hydrolýza

Enzymatický rozklad lignocelulóзовej biomasy je kvôli jej štruktúrnym zložkám a ich vzájomným interakciám veľmi náročný. Uskutočňuje sa pôsobením celúlázy, čo je kombinácia hydrolytických enzýmov katalyzujúcich reakciu celulózy s vodou za vzniku kratších reťazcov, až nakoniec rozpustnej glukózy [27].

Samotné β -1,4-glykozidové väzby nie je náročné rozštiepiť, avšak vďaka vodíkovým väzbám tvorí celulóza pevne zbalené kryštály, cez ktoré niekedy nemôže preniknúť voda ani enzýmy. V týchto situáciách je efektívna exoglukonáza, podskupina celúlázy štiepiaca terminálne glykozidové väzby, pričom sa uvoľňujú celobióza a glukóza. Amorfné oblasti celulózy zas umožňujú preniknutie endoglukonázy, ďalšej podskupiny celúlázy, ktorá katalyzuje hydrolýzu vnútorných väzieb. Pôsobením endoglukonázy vznikajú oligosacharidy o rôznej molekulovej hmotnosti. Hydrolýza amorfnej celulózy prebieha rýchlejšie ako hydrolýza kryštalickej celulózy. Hydrolýzu vzniknutých molekúl celobiózy katalyzuje β -glukozidáza [17,28].



Obrázok 10: Znázornenie enzymatickej hydrolýzy celulózy [29]

2.3 Bakteriálne kmene využívané na produkciu PHA

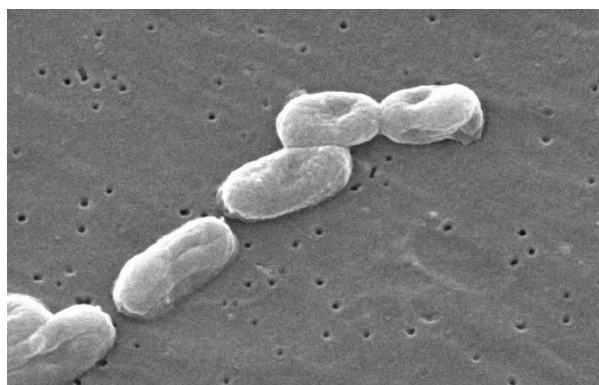
Produkčné bakteriálne kmene využívané k priemyselnej produkcii PHA by mali spĺňať niekoľko dôležitých kritérií, ako je nepatogenita, čisté genomické pozadie, jednoduchá genomová manipulácia a rýchly rast na minerálnom médiu. Taktiež by nemali by produkovať toxické látky. Vhodnou vlastnosťou je širšie rozmedzie teploty a hodnoty pH, pri ktorom sú

baktérie schopné rýchleho rastu. Pre jednoduchú izoláciu a purifikáciu PHA z biomasy by bakteriálne bunky mali byť veľké, s krehkou bunkovou stenou a ľahkou flokuláciou [6].

Na produkciu PHA sa používajú zástupcovia rodov *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Klebsiella*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, a mnohé iné [15].

2.3.1 *Burkholderia cepacia*

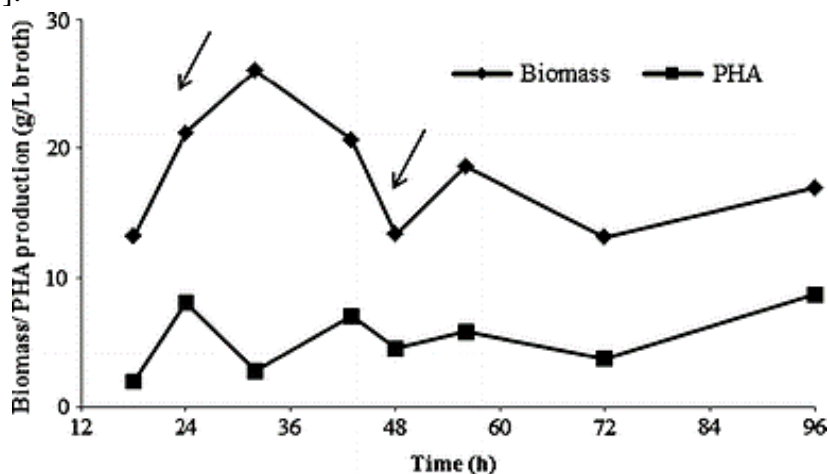
Burkholderia cepacia je gram-negatívna baktéria schopná utilizovať množstvo uhlíkových zdrojov a produkovať celú triedu polyhydroxyalkanoátov vrátane homopolymérov P(3HB) a P(3HV). Pri špecifických kultivačných stratégiách dokáže produkovať aj kopolymér hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu P(3HB-co-3HV) [30].



Obrázok 11: *Burkholderia cepacia* [31]

2.3.1.1 Produkcia PHA baktériou *Burkholderia cepacia* na hemicelulóзовom hydrolyzáte javorového dreva

Burkholderia cepacia bola kultivovaná na detoxikovanom hemicelulóзовom hydrolyzáte javorového dreva spôsobom fed-batch po dobu 96 hodín. Kultivácia prebiehala vo fermentore o objeme 1 l, pričom začiatočnú vsádzku tvoril 40% hydrolyzát obsahujúci 31,9 g·l⁻¹ xylózy a 7,5 g·l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ako zdroj dusíka. V 24. a 48. hodine kultivácie bolo pridaných po 200 ml hydrolyzátu [30].



Obrázok 12: Výsledky kultivácie *B. cepacia* na hydrolyzáte javorového dreva; šípky označujú prídanie hydrolyzátu do fermentoru [30]

Najviac biomasy bolo dosiahnuté v 32. hodine fermentácie a najvyšší podiel PHA v sušine biomasy na konci kultivácie – v 96. hodine (51,4 %). Finálny výťažok predstavoval 0,37 g biomasy na 1 g xylózy a 0,19 g PHA na 1 g xylózy.

Získaný P(3HB) mal molekulovú hmotnosť 450,8 kDa, teplotu skleného prechodu 7,3 °C, teplotu topenia 174,4 °C a teplotu rozkladu 268,6 °C [30]. V *tabuľke 2* sú uvedené niektoré vlastnosti PHA, zistené pri kultivácii baktérie *Burkholderia cepacia* na rôznych typoch substrátu: detoxikovaný hydrolyzát javorového dreva, 2,2% xylóza a 3% glycerol.

Tabuľka 2: Vlastnosti PHA získaných kultiváciou baktérie *Burkholderia cepacia* na rôznych substrátoch [30]

	t. topenia [°C]	t. skleného prechodu [°C]	t. rozkladu [°C]	molekulová hmotnosť [kDa]
PHA z detoxikovaného hydrolyzáta javorového dreva	174,4	7,3	268,6	450,8
PHA z 2,2% xylózy ako jediného zdroja uhlíka	177	4,0	273,4 (0,8% 3HV)	469
PHA z 3% glycerolu ako jediného zdroja uhlíka	181,9	1,6	281,5	87–162

2.3.2 *Burkholderia sacchari*

Burkholderia sacchari (DSM 17165) je gram-negatívna baktéria izolovaná z pôdy plantáže cukrovej trstiny v Brazílii. Bolo zistené, že v prítomnosti sacharózy ako jediného zdroja uhlíka dokáže akumulovať PHB do 68 % bunkovej sušiny [32]. Je taktiež schopná inkorporácie 3HV, 4HB a 3HHx do polyméru PHA [33].

Tabuľka 3: Obsah PHA a podiel monoméru 3HV v sušine pri použití rôznych prekurzorov [33]

prekurzor	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HB [%]	podiel 3HV [%]
k. octová	1,32	11,2	100	-
k. propiónová	1,97	44,8	71,6	28,4
k. valérová	1,25	35,9	34,7	65,3
k. hexánová	2,08	51,5	98,4	-
k. heptánová	2,35	23,4	71,9	28,1
k. oktánová	2,05	36,3	100	-
k. nonánová	1,81	26,2	80,2	19,8
k. dekánová	1,71	35,5	100	-
k. undekánová	2,38	32,2	78,2	21,8
k. dodekánová	1,87	45,1	100	-
k. palmitová	2,32	25,9	100	-
k. linolová	1,01	14,8	100	-

2.3.2.1 Produkcia P(3HB-co-3HV)

Baktéria *Burkholderia sacchari* bola kultivovaná za účelom tvorby kopolyméru P(3HB-co-3HV) zo sacharózy a kyseliny propiónovej. Získaný kopolymér obsahoval podiel 3HV od 6,5 – 40 mol. %, pričom výťažnosť 3HV z kyseliny propiónovej ($Y_{3HV/prop}$) predstavovala 1,10 – 1,34 g·g⁻¹ [12].

2.3.2.2 Produkcia P(3HB-co-4HB)

V inom experimente bola baktéria *Burkholderia sacchari* využitá k tvorbe kopolyméru P(3HB-co-4HB) z hydrolyzátu pšeničnej slamy a gama-butyrolaktónu ako prekursoru monoméru 4HB. Kultivácia prebiehala kontinuálne v 2 l reaktore s počiatočným objemom vsádky 1,3 l. Pridávaný roztok obsahoval hydrolyzát pšeničnej slamy o koncentrácii glukózy 465,3 g·l⁻¹. Hydrolyzát ďalej obsahoval 146,3 g·l⁻¹ xylózy a 41,5 g·l⁻¹ arabinózy [5].

Tabuľka 4: Obsah PHA a 4HB v sušine doiahnutý pri kultivácii na hydrolyzáte pšeničnej slamy s použitím gama-butyrolaktónu ako prekursoru [5]

koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	výt'azok PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 4HB [mol. %]
88	24	27	5
80	18	22	5,5

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie, materiál a prístroje

3.1.1 Bakteriálne kmene

V experimentálnej časti práce boli použité bakteriálne kultúry *Burkholderia cepacia* CCM 2656 a *Burkholderia sacchari* DSM 17165.

3.1.2 Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov

<i>Burkholderia sacchari</i> :	Nutrient Broth, Himedia (India)
<i>Burkholderia cepacia</i> :	Yeast Extract
	Proteose Peptone
	Casamino Acids
	Glucose
	Soluble Starch
	Na-pyruvate
	K ₂ HPO ₄
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O

3.1.3 Prístroje

Centrifúga Boeco C-28, Hettich Mikro 200
Analytické váhy Boeco
Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments
Termostat, LS-35
Temperovaná trepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.
Plynový chromatograf
- Trace GC Ultra FID detektor, Finnigan (USA)
- Kolóna – DB-WAX 30 m by 0,25 mm pre stanovenie P(3HB)
Fermentor Sartorius BIOSTAT 51 B® plus
ELISA reader BIOTEK EL 808
Mikrocentrifúga Boeco

3.2 Kultivácia baktérií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*

3.2.1 Uchovávanie kultúry a príprava inokula:

Inokula baktérií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* boli pripravené do 100 ml Erlenmeyerových bánk v objeme 50 ml tekutého živného média. Ich kultivácia prebiehala na trepačke pri 30 °C. Po 24 hodinách boli inokulami naočkované produkčné médiá.

3.2.2 Živné média

Pre prípravu inokula baktérie *Burkholderia cepacia* bolo použité tekuté minerálne médium o zložení:

Yeast Extract	0,5 g
Proteose Peptone	0,5 g
Casamino Acids	0,5 g
Glucose	10 g
Soluble Starch	0,5 g
Na-pyruvate	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
destilovaná voda	1000 ml

Pre prípravu inokula baktérie *Burkholderia sacchari* bolo použité tekuté komerčne dostupné živné médium Nutrient Broth o zložení:

Beef extrakt	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	2 g
Destilovaná voda	1000 ml

Ako produkčné médium bolo použité minerálne médium o zložení:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	6,8 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
NH ₄ -Fe(III) citrát	0,06 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
roztok glukózy (100g/l)	40 ml
roztok stopových prvkov	1 ml
destilovaná voda	1000 ml

Kultúry boli kultivované na trepačke pri teplote 30 °C po dobu 72 hodín.

3.3 Stanovenie biomasy

Koncentrácia biomasy bola stanovovaná spektrofotometricky prostredníctvom merania zákalu. Kultúry boli vhodne nariadené destilovanou vodou. Následne bola premeraná ich absorbanca pri vlnovej dĺžke $\lambda = 630$ nm oproti destilovanej vode. Koncentrácia biomasy bola vypočítaná z kalibračnej priamky.

3.3.1 Stanovenie kalibračnej priamky

Kalibračná priamka bola zostrojená riedením suspenzie buniek destilovanou vodou. Pre stanovenie sušiny bolo odobraných 10 ml kultúry. Roztok biomasy bol stočený (8000 rpm, 5 minút). Supernatant bol zliaty, k biomase bolo pridaných 10 ml destilovanej vody

a centrifugácia bola zopakovaná ešte raz. Roztok bol zliaty a biomasa vysušená v sušiarňi v predom zvážených centrifugačných skúmavkách. Po vybratí a ochladení boli skúmavky znovu zvážené. Rozdiel hmotností tvorila hmotnosť biomasy v 10 ml kultúry. Riedením kultúry o známej koncentrácii biomasy bola zostrojená kalibračná priamka $A_{630} = f(C_{\text{biomasa}})$.

3.4 Stanovenie koncentrácie PHA

Celková koncentrácia PHA v sušine, ako aj koncentrácia P(3HB) a P(3HV) boli stanovované plynovou chromatografiou s FID detekciou. Do vialiek bolo navážených približne 10 mg sušiny z paralelných kultivácií s presnosťou na 0,1 mg. K vzorkám bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírovej v metanole a uzavreté vialky boli umiestnené do termostatu vyhriateho na 95 °C po dobu troch hodín. Po hydrolýze boli vzorky extrahované v 0,5 ml vody a pre analýzu bolo odobratých 50 µl spodnej chloroformovej fázy. Ku každej vzorke bolo pridaných 950 µl chloroformu a vzorky boli analyzované plynovým chromatografom.

3.4.1 Stanovenie kalibračnej priamky

Kalibračná priamka bola zhotovená pomocou štandardov P(3HB) a P(3HB-co-3HV), ktoré boli v koncentráciách 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mg·ml⁻¹ napipetované do vialiek a doplnené na 1 ml chloroformom. K roztokom bolo pridaných 0,8 ml 15% kyseliny sírovej v metanole a uzavreté vialky boli umiestnené do termostatu vyhriateho na 95 °C po dobu troch hodín. Po hydrolýze boli vzorky extrahované v 0,5 ml vody a pre analýzu bolo odobratých 50 µl spodnej chloroformovej fázy. Ku každej vzorke bolo pridaných 950 µl chloroformu a vzorky boli analyzované plynovým chromatografom s FID detekciou.

3.5 Stanovenie glukózy

V získaných supernatantoch bola stanovovaná koncentrácia nevyužitej glukózy. Ako činidlo bola použitá kyselina 3,5-dinitrosalicylová. Do skúmavky bolo napipetované 0,1 ml vzorky supernatantu, 0,4 ml destilovanej vody a 0,5 ml činidla (1 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej, 20 ml hydroxidu sodného o koncentrácii 2 mol·l⁻³, 50 ml vody, 30 g vínanu sodnodraselného). Následne boli skúmavky umiestnené do vodného kúpeľa vyhriateho na 70 °C na dobu 10 minút. Po vychladení bolo k vzorkám pridaných 10 ml destilovanej vody a pomocou spektrofotometra bola premeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke $\lambda = 540$ nm oproti blanku, ktorý tvorilo činidlo s destilovanou vodou. Koncentrácia glukózy bola vypočítaná z kalibračnej priamky.

3.5.1 Stanovenie kalibračnej priamky

Pre stanovenie kalibračnej priamky boli pripravené roztoky o známej koncentrácii glukózy. Z každého roztoku bolo odobraných 0,5 ml do skúmavky a pridaných 0,5 ml činidla – kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej. Rovnakým postupom ako pri stanovení glukózy bola premeraná absorbanca oproti blanku a zostrojená kalibračná priamka $A_{540} = f(C_{\text{glukóza}})$.

3.6 Stanovenie nevyužitých prekurzorov

Koncentrácia prekurzorov v supernatantoch bola stanovovaná iónovou chromatografiou. V skúmavkách bolo 0,5 ml supernatantu zriedených deionizovanou vodou o objeme 9,5 ml. Vzorky boli analyzované iónovým chromatografom.

3.7 Štúdium vplyvu typu prekursoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine

V Erlenmeyerových bankách boli kultivované baktérie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* v objeme 100 ml živného média. Po 24 hodinách kultivácie boli pridané nasledujúce prekursory: do dvoch bánk propionát ($3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), do ďalších dvoch valerát ($3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a do dvoch bánk levulinát ($3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Dve kultivácie zostali ako kontrolné, bez pridania prekursoru.

Kultivácia bola ukončená po ďalších 48 hodinách. V narastených kultúrach bola stanovovaná koncentrácia biomasy spektrofotometrickým meraním zákalu, koncentrácia PHA v sušine plynovou chromatografiou, v supernatantoch bola stanovovaná zvyšková glukóza kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou a koncentrácia prekursorov iónovou chromatografiou.

3.8 Štúdium vplyvu koncentrácie prekursoru a času pridania prekursoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine

Vplyv koncentrácie prekursoru a času pridania prekursoru bol sledovaný na kultivácii baktérie *Burkholderia cepacia*. Použitým prekursorom bol propionát v troch koncentráciách: 0,5; 1 a $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Propionát o týchto koncentráciách bol pridaný po 24 a 48 hodinách kultivácie. Celková kultivácia trvala 72 hodín, potom boli kultúry stočené a analyzované. V jednotlivých vzorkách bola stanovovaná koncentrácia biomasy spektrofotometrickým meraním zákalu, koncentrácia PHA v sušine plynovou chromatografiou, v supernatantoch bola stanovovaná zvyšková glukóza kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou a koncentrácia prekursoru iónovou chromatografiou.

3.9 Štúdium produkcie PHA z kukuričného odpadu

3.9.1 Stanovenie celulózy

Do 100 ml Erlenmeyerovej banky bolo navážených približne 0,8 g vzorky s presnosťou na 0,0001 g. Následne bolo pridaných 30 ml zmesi 80% kyseliny octovej a kyseliny dusičnej v pomere 10:1. Banka so suspenziou bola vložená do vriaceho vodného kúpeľa po dobu 1 hodiny. Potom bola suspenzia kvantitatívne prevedená do predom zväženej frity s veľkosťou pórov $15 \mu\text{m}$ (označenie S4) a pomocou vývevy prefiltrovaná. Filtračný zvyšok na frite bol premytý etanolom a frita bola vysušená v sušiarňi pri 100°C . Po usušení frity a vychladnutí v exikátore bola zväžená na analytických váhach. Vzorka z frity bola prevedená do Erlenmeyerovej banky pomocou etanolu, ktorý bol následne odparený pomocou vodného kúpeľa. Do banky bolo pridaných 20 ml 72% kyseliny sírovej a suspenzia sa nechala hydrolyzovať na trepačke pri 30°C 1 hodinu. Hydrolyzát bol prevedený na fritu s veľkosťou pórov $30 \mu\text{m}$ (označenie S3) a prefiltrovaný. Frita so zvyškom bola vysušená v sušiarňi a po vychladení v exikátore zväžená.

3.9.2 Štúdium vplyvu typu hydrolýzy kukuričnej siláže na produkciu PHA

3.9.2.1 Príprava hydrolyzátov

Pre kultiváciu boli navážené 3 vzorky kukuričného odpadu – suchého šúpolia a stoniek o hmotnostiach približne 12 g. Vzorky boli podrobené trom typom hydrolýzy: enzymatickej (vzorka A), zriedenou kyselinou sírovou (vzorka B) a kombináciou oboch spôsobov (vzorka C). Vzorka A bola doplnená dihydrogenfosforečnanom draselným ($7,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) na objem 250 ml. K vzorke bolo pridaných 0,5 ml enzýmu celulózy. Vzorka B bola doplnená 1% kyselinou

sírovou na objem 250 ml a varená po dobu 30 minút pri teplote 120 °C. Vzorka C bola doplnená na objem 250 ml taktiež 1% kyselinou sírovou a opäť vystavená 30 minútovému varu pri 120 °C. Po vychladení a úprave pH bolo pridaných 0,5 ml enzýmu celulózy. U všetkých vzoriek bolo upravené pH pomocou hydroxidu sodného na hodnotu približne 4,5. Hydrolýza vzoriek B a C prebiehala na trepačke pri 50 °C. Všetky vzorky boli hydrolyzované 24 hodín. Po ukončení hydrolýzy boli vzorky prefiltrované, filtračné zvyšky boli vysušené v sušiarňi a zvážené. Filtráty boli po úprave pH vysterilované. Vo všetkých hydrolyzátoch bola stanovená koncentrácia glukózy.

3.9.2.2 Kultivácia baktérií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* na hydrolyzáte

Na kultiváciu boli do Erlenmeyerových bánk pripravené živné médiá o objeme 50 ml. K živným médiám bolo pridaných po 50 ml pripravených hydrolyzátoch. Kultivácia prebiehala na trepačke pri 30 °C po dobu 72 hodín. Po ukončení kultivácie bola stanovená koncentrácia biomasy spektrofotometrickým meraním zákalu a narastené kultúry boli scentrifugované. V supernatantoch bola stanovená koncentrácia glukózy, biomasa bola vysušená v sušiarňi a plynovou chromatografiou boli stanovené PHA.

3.9.3 Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu na produkciu PHA

3.9.3.1 Príprava hydrolyzátu kukuričnej siláže

Hydrolyzát kukuričnej siláže bol pripravený kombináciou enzymatickej hydrolýzy a hydrolýzy zriedenou kyselinou sírovou. 25 g kukuričnej siláže bolo doplnených 500 ml 1% kyseliny sírovej. Zmes bola vysterilovaná v autokláve a po vychladení bolo upravené pH na hodnotu približne 4,5. Následne bolo pridaných 0,5 ml enzýmu celulózy a zmes bola hydrolyzovaná na trepačke pri teplote 50 °C 24 hodín. Pred kultiváciou bol pripravený hydrolyzát ešte raz vysterilovaný.

3.9.3.2 Kultivácia baktérií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*

Inokula baktérii *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* boli pripravené do objemu 50 ml a kultivované 24 hodín. Pripravený hydrolyzát bol pridaný k sterilnému produkčnému médiu v troch rôznych pomeroch: 25:75, 50:50 a 75:25 tak, aby výsledný objem živného média bol vždy 100 ml. Baktérie boli kultivované na pripravených médiách po dobu 72 hodín. Následne bola v jednotlivých vzorkách zmeraná koncentrácia biomasy a kultúry boli stočené. V sušine biomasy bol stanovený podiel PHA a v supernatantoch nevyužitý cukry.

3.9.4 Kultivácia baktérie *Burkholderia cepacia* na hydrolyzáte kukuričnej siláže

Inokula baktérie *Burkholderia cepacia* boli pripravené v objeme 50 ml a kultivované 24 hodín na trepačke pri teplote 30 °C. Hydrolyzát kukuričnej siláže bol pripravený rovnakým postupom ako v predchádzajúcom experimente. Do Erlenmeyerových bánk boli pripravené živné médiá zmiešaním minerálneho produkčného média a hydrolyzátu v pomere 50:50, s celkovým objemom 100 ml. Do tohto média bolo preočkované inokulum (10 ml), pridaný roztok stopových prvkov (0,1 ml) a kultúra bola kultivovaná ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Po 24 hodinách bola zmeraná koncentrácia biomasy kultúry.

Na kultiváciu vo fermentore bolo pripravené minerálne produkčné médium v objeme 450 ml. Fermentor spolu s médiom bol vysterilovaný v autokláve. K médiu bolo pridaných 900 ml

vysterilovaného hydrolyzátu, roztok stopových prvkov a 150 ml kultúry *Burkholderia cepacia*. Celkový objem vsádzky bol 1,5 l.

Z fermentoru bolo odobraných 6 vzoriek v rôznych časoch fermentácie. V jednotlivých vzorkách bola stanovovaná koncentrácia narastenej biomasy, množstvo naakumulovaných PHA v sušine a koncentrácia nevyužitých cukrov v supernatantoch.

3.9.5 Kultivácia baktérie *Burkholderia sacchari* na hydrolyzáte kukuričnej siláže

Inokula baktérie *Burkholderia sacchari* boli pripravené v objeme 50 ml a kultivované 24 hodín na trepačke pri teplote 30 °C. Po tomto čase boli inokula preočkované do živných médií o rovnakom zložení a objeme 100 ml. Po 24 hodinách bola kultivácia prevedená do fermentoru, pričom bolo použitých 150 ml kultúry, 450 ml minerálneho média a 900 ml hydrolyzátu kukuričnej siláže.

Počas kultivácie bolo odobraných sedem vzoriek v rôznych časoch fermentácie. V týchto vzorkách bola zmeraná koncentrácia biomasy, stanovený podiel PHA v sušine a množstvo nevyužitých cukrov v supernatantoch.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Kalibračné priamky

4.1.1 Stanovenie koncentrácie biomasy

Koncentrácia biomasy bola stanovovaná spektrofotometricky prostredníctvom merania zákalu pri vlnovej dĺžke $\lambda = 630$ nm. Kalibračná rada bola zhotovená riedením kultúry o známej koncentrácii biomasy. Hmotnosť sušiny bola stanovená v troch paralelných meraniach.

Tabuľka 5: Stanovenie koncentrácie sušiny biomasy baktérie *Burkholderia sacchari*

hmotnosť sušiny [g]	koncentrácia sušiny biomasy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
0,0121	1,21
0,0127	1,27
0,0121	1,21
priemer	$1,2300 \pm 0,0283$

Tabuľka 6: Stanovenie koncentrácie sušiny biomasy u baktérie *Burkholderia cepacia*

hmotnosť sušiny [g]	koncentrácia sušiny biomasy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
0,0132	1,32
0,0115	1,15
0,0131	1,31
priemer	$1,2600 \pm 0,0779$

Tabuľka 7: Závislosť absorbancie na koncentrácii biomasy u baktérie *Burkholderia sacchari*

koncentrácia biomasy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	A_{630}
0,041	0,141
0,082	0,273
0,123	0,383
0,164	0,527
0,205	0,684
0,246	0,829
0,287	0,950
0,328	1,093
0,369	1,208
0,410	1,344

Zo závislosti absorbancie na koncentrácii biomasy baktérie *Burkholderia sacchari* bola stanovená rovnica kalibračnej priamky: $y = 3,2971x$. Graf kalibračnej závislosti je uvedený v prílohe A.

Tabuľka 8: Závislosť absorbancie na koncentrácii biomasy u baktérie *Burkholderia cepacia*

koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	A ₆₃₀
0,042	0,105
0,084	0,210
0,126	0,335
0,168	0,447
0,210	0,571
0,252	0,694
0,294	0,805
0,336	0,921
0,378	1,015
0,420	1,119

Zo závislosti absorbancie na koncentrácii biomasy baktérie *Burkholderia cepacia* bola stanovená rovnica kalibračnej priamky: $y = 2,7004x$. Graf kalibračnej závislosti je uvedený v prílohe A.

4.1.2 Stanovenie PHA

Kalibračné priamky pre stanovenie koncentrácií P(3HB) a monoméru 3HV boli zostrojené riedením roztokov štandardov o vhodných koncentráciách a následnou analýzou vzoriek plynovou chromatografiou s FID detekciou.

Zo závislosti plochy pík na koncentrácii P(3HB) bola zostrojená rovnica kalibračnej priamky $y = 0,8183x$. Graf kalibračnej závislosti je uvedený v prílohe A.

Zo závislosti plochy pík na koncentrácii 3HV bola zostrojená rovnica kalibračnej priamky $y = 0,9212x$. Graf kalibračnej závislosti je uvedený v prílohe A.

4.1.3 Stanovenie glukózy

Kalibračná rada pre stanovenie glukózy bola pripravená riedením roztokov glukózy o známej koncentrácii. Po reakcii s činidlom a vhodnom zriedení bola premeraná ich absorbancia pri vlnovej dĺžke $\lambda = 540$ nm.

Tabuľka 9: Závislosť absorbancie na koncentrácii glukózy

koncentrácia glukózy [g·l ⁻¹]	A ₅₄₀
0,15	0,037
0,3	0,067
0,6	0,159
0,9	0,286
1,2	0,362
1,5	0,449
1,8	0,555
2,1	0,651
2,4	0,858
2,7	0,843
3	0,938

Zo závislosti absorbancie pri vlnovej dĺžke $\lambda = 540$ nm na koncentrácii glukózy bola stanovená rovnica kalibračnej priamky: $y = 0,3093x$. Graf kalibračnej závislosti je uvedený v prílohe A.

4.2 Štúdium vplyvu typu prekurzoru na nárast biomasy a podiel PHA

Vplyv pridaného prekurzoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine bol sledovaný u baktérií *Burkholderia sacchari* aj *Burkholderia cepacia*. Použitými prekurzormi boli propionát, valerát a levulinát.

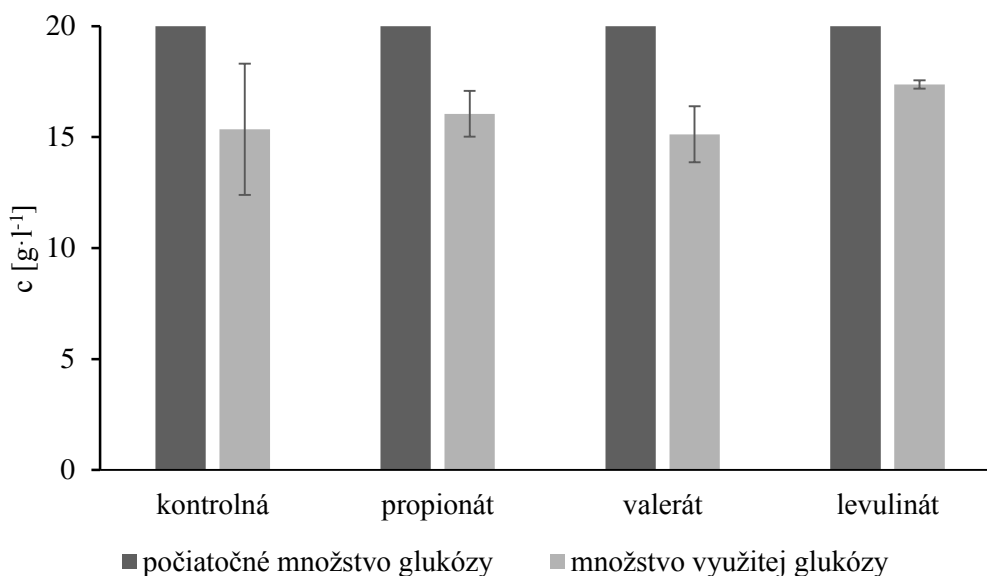
Tabuľka 10: Stanovenie biomasy, PHA, podielu 3HV a výtťažnostných koeficientov baktérie *Burkholderia sacchari*

prekurzor	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	Y _{3HV/prek} [mol·mol ⁻¹]	Y _{P/S} [-]
kontrolná	4,54 ± 0,11	5,63 ± 0,30	58,93 ± 2,39	1,73 ± 0,06	-	0,411 ± 0,016
propionát	1,20 ± 0,03	2,80 ± 0,99	16,59 ± 4,99	11,36 ± 1,62	0,023 ± 0,001	0,062 ± 0,010
valerát	1,02 ± 0,03	4,16 ± 0,00	18,30 ± 5,34	11,54 ± 2,93	0,031 ± 0,000	0,059 ± 0,022
levulinát	1,23 ± 0,03	2,35 ± 0,79	27,67 ± 3,45	6,44 ± 1,49	0,035 ± 0,000	0,099 ± 0,021

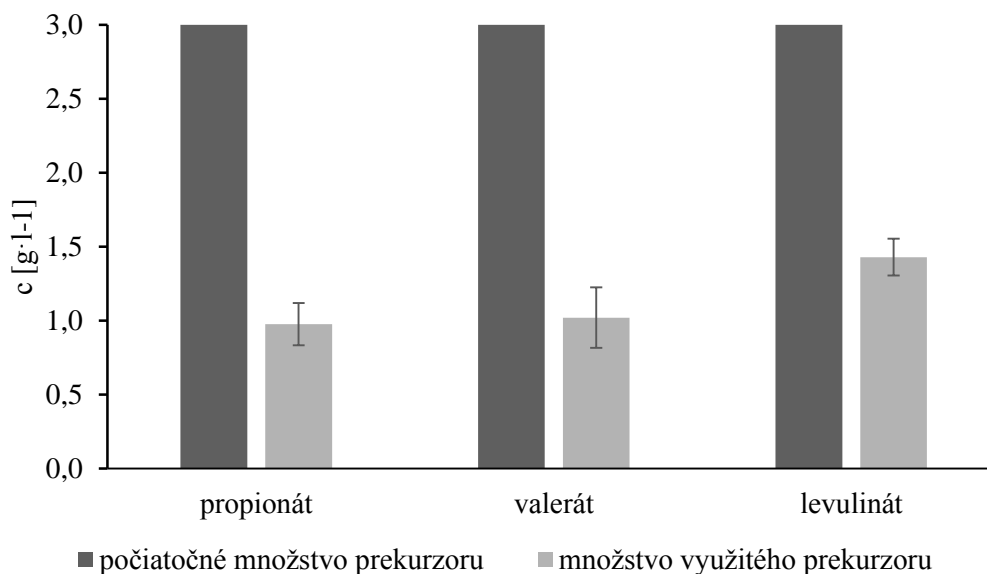
Tabuľka 11: Koncentrácie zistených organických kyselín u baktérie *Burkholderia sacchari* po ukončení kultivácie

prekurzor	k. octová [g·l ⁻¹]	k. propiónová [g·l ⁻¹]	k. valérová [g·l ⁻¹]	k. levulinová [g·l ⁻¹]
kontrolná	2,672 ± 0,425	0,049 ± 0,021	-	-
propionát	2,864 ± 0,063	2,024 ± 0,143	-	-
valerát	2,305 ± 0,003	0,029 ± 0,008	1,979 ± 0,204	0,201 ± 0,000
levulinát	2,330 ± 0,022	-	0,140 ± 0,000	1,571 ± 0,124

Graf 1: Znázornenie počiatočného a využitého množstva glukózy (*Burkholderia sacchari*)



Graf 2: Znázornenie počiatočného a využitého množstva prekurzoru (*Burkholderia sacchari*)



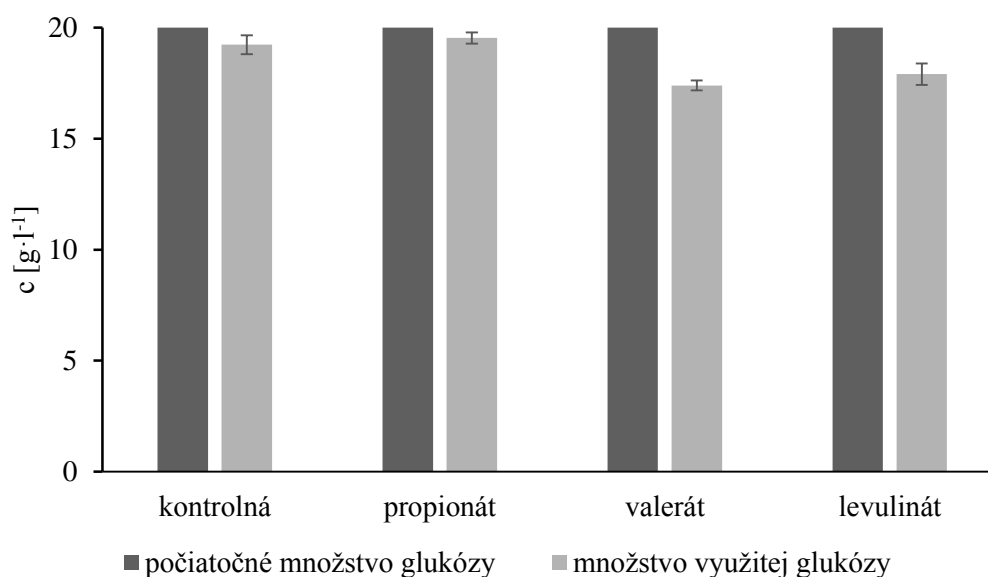
Tabuľka 12: Stanovenie biomasy, PHA, podielu 3HV a výtlačnostných koeficientov baktérie *Burkholderia cepacia*

prekurzor	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	Y _{3HV/prek} [mol·mol ⁻¹]	Y _{P/S} [-]
kontrolná	8,80 ± 0,81	6,32 ± 0,25	60,46 ± 1,00	2,22 ± 0,05	-	0,293 ± 0,016
propionát	2,01 ± 0,12	0,99 ± 0,16	42,10 ± 3,21	9,03 ± 1,93	0,050 ± 0,016	0,118 ± 0,062
valerát	1,36 ± 0,11	0,98 ± 0,25	57,00 ± 0,00	2,98 ± 0,00	0,036 ± 0,000	0,239 ± 0,000
levulinát	1,24 ± 0,07	1,72 ± 0,36	51,08 ± 6,06	5,06 ± 1,52	0,035 ± 0,001	0,131 ± 0,044

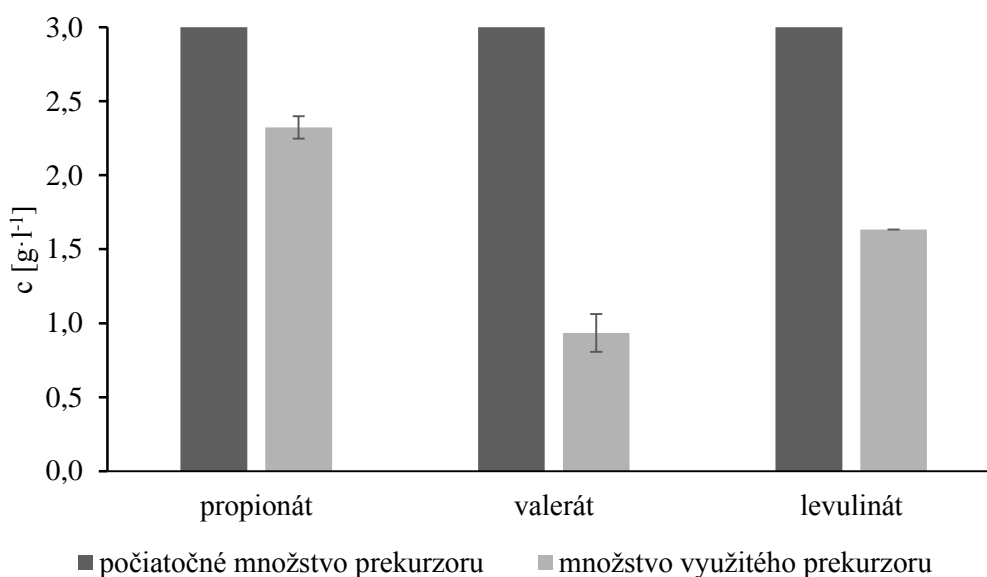
Tabuľka 13: Koncentrácie zistených organických kyselín u baktérie *Burkholderia cepacia* po ukončení kultivácie

prekurzor	k. octová [g·l ⁻¹]	k. propiónová [g·l ⁻¹]	k. valérová [g·l ⁻¹]	k. levulinová [g·l ⁻¹]
kontrolná	2,189 ± 0,002	0,131 ± 0,000	-	-
propionát	2,378 ± 0,006	0,677 ± 0,075	0,390 ± 0,000	-
valerát	2,110 ± 0,009	0,027 ± 0,006	2,066 ± 0,128	0,350 ± 0,000
levulinát	2,047 ± 0,000	-	0,073 ± 0,000	1,367 ± 0,000

Graf 3: Znázornenie počiatocného a využitého množstva glukózy (*Burkholderia cepacia*)



Graf 4: Znázornenie počiatocného a využitého množstva prekursoru (*Burkholderia cepacia*)



Všeobecne možno povedať, že prídavok všetkých testovaných prekursorov výrazne inhiboval rast bakteriálnej kultúry v porovnaní s kontrolnou kultiváciou. Pri baktérii *Burkholderia sacchari* bol zaznamenaný najvyšší nárast biomasy s použitím levulinátu ako prekursoru. Rozdiely v koncentráciách však neboli veľmi výrazné. Výraznejší rozdiel vykazovala koncentrácia biomasy pri kultivácii baktérie *Burkholderia cepacia* pri použití propionátu ako prekursoru. Propionát sa ukázal ako najvýnosnejší z hľadiska nárastu biomasy kultúry, z čoho vyplýva, že je zo všetkých testovaných prekursorov najmenej toxický.

Motiváciou pre použitie prekursorov vedúcich k akumulácii kopolyméru sú lepšie mechanické vlastnosti tohto materiálu oproti homopolyméru PHB, napríklad pevnosť v ťahu výrazne rastie s rastúcim zastúpením 3HV v kopolyméri.

Najvyšší obsah PHA pri kultivácii *Burkholderie cepacia* bol dosiahnutý s použitím valerátu ako prekursoru. Pri kultivácii v živnom médiu s obsahom propionátu bolo v celkovom obsahu PHA najvyššie percentuálne zastúpenie 3HV oproti ostatným kultiváciám. Táto kultivácia vykazovala najvyšší výťažnostný koeficient pre tvorbu 3HV z prekursoru. Znamená to, že najlepšie podmienky pre inkorporáciu monoméru 3HV do polyméru PHA je možné dosiahnuť s prídavkom propionátu do kultivačného média.

Kultiváciou baktérie *Burkholderia sacchari* boli dosiahnuté nižšie koncentrácie PHA v sušine. Najvyšší obsah vykazovala kultivácia s použitím levulinátu ako prekursoru. Zastúpenie 3HV v PHA bolo najvyššie s použitím valerátu a propionátu, pričom tieto výsledky sa líšili len minimálne. Výťažnostné koeficienty pre tvorbu 3HV z prekursoru boli veľmi podobné.

Stanovením organických kyselín iónovou chromatografiou bolo zistené, že pri kultiváciách vzniká pravdepodobne ako vedľajší extracelulárny metabolit kyselina octová, a to v prekvapivo vysokých koncentráciách (cca 2 g·l⁻¹), ktoré sú takmer porovnateľné s hlavným produktom zamýšľanej technológie – PHA. Tento jav je zaujímavý aj preto, že rovnako ako PHA, tak aj kyselina octová sa odvodzujú od toho istého metabolitu – acetyl-CoA. Kyselina octová je teda z nášho pohľadu nežiaducim vedľajším metabolitom, pretože „konkuruje“ tvorbe hlavného produktu – PHA. Súvislosťou medzi extracelulárnou produkciou acetátu a akumuláciou PHA

sa podľa našich znalostí zatiaľ nikto systematicky nevenoval, preto by si táto téma určite zaslúžila väčšiu pozornosť.

4.3 Štúdium vplyvu koncentrácie prekursoru a času pridania prekursoru na nárast biomasy a podiel PHA v sušine

Vplyv koncentrácie prekursoru a času pridania prekursoru do kultúry bol sledovaný s použitím propionátu. Kultivovanou baktériou bola *Burkholderia cepacia*. Propionát bol pridaný po 24 hodinách v troch rôznych koncentráciách: 0,5; 1 a 2 g·l⁻¹. Rovnaké koncentrácie boli použité aj v prídavku po 48 hodinách.

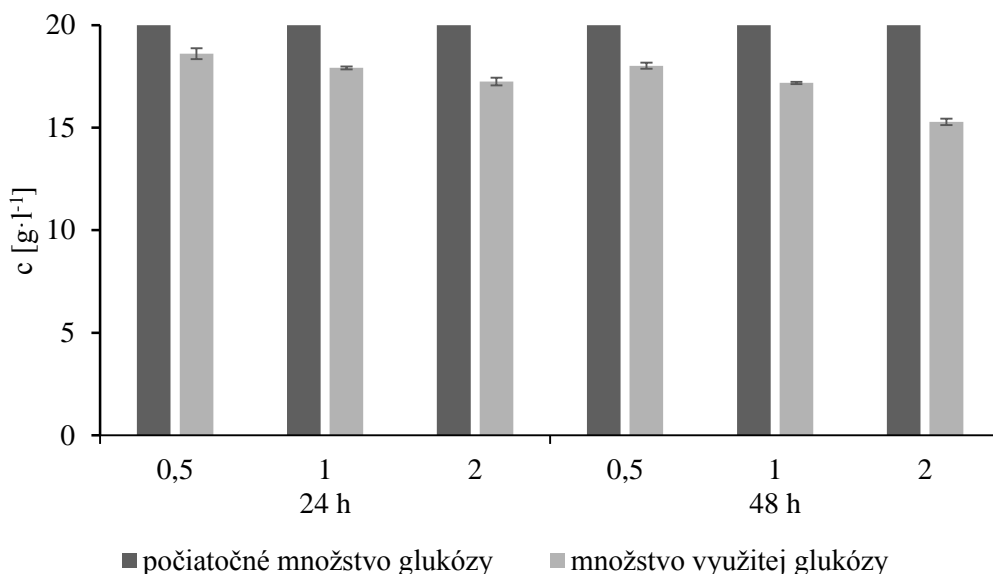
Tabuľka 14: Stanovenie biomasy, PHA, podielu 3HV a výťažnostných koeficientov

t [h]	konc. prop. [g·l ⁻¹]	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	Y _{3HV/prek} [mol·mol ⁻¹]	Y _{P/S} [-]
24	0,5	4,19 ± 0,92	4,67 ± 0,49	43,40 ± 3,96	11,82 ± 0,25	0,691 ± 0,087	0,251 ± 0,026
	1,0	2,51 ± 0,17	4,17 ± 0,17	38,83 ± 0,40	5,73 ± 0,31	0,149 ± 0,006	0,233 ± 0,010
	2,0	2,04 ± 0,33	3,37 ± 0,56	37,76 ± 3,16	4,10 ± 0,46	0,042 ± 0,002	0,195 ± 0,033
48	0,5	5,47 ± 0,07	5,39 ± 00	49,02 ± 0,00	3,38 ± 0,00	0,069 ± 0,000	0,299 ± 0,000
	1,0	5,98 ± 0,14	4,82 ± 0,00	45,04 ± 0,00	2,30 ± 0,00	0,069 ± 0,000	0,281 ± 0,000
	2,0	5,19 ± 0,05	5,33 ± 0,19	46,73 ± 2,09	1,96 ± 0,06	0,033 ± 0,000	0,349 ± 0,013

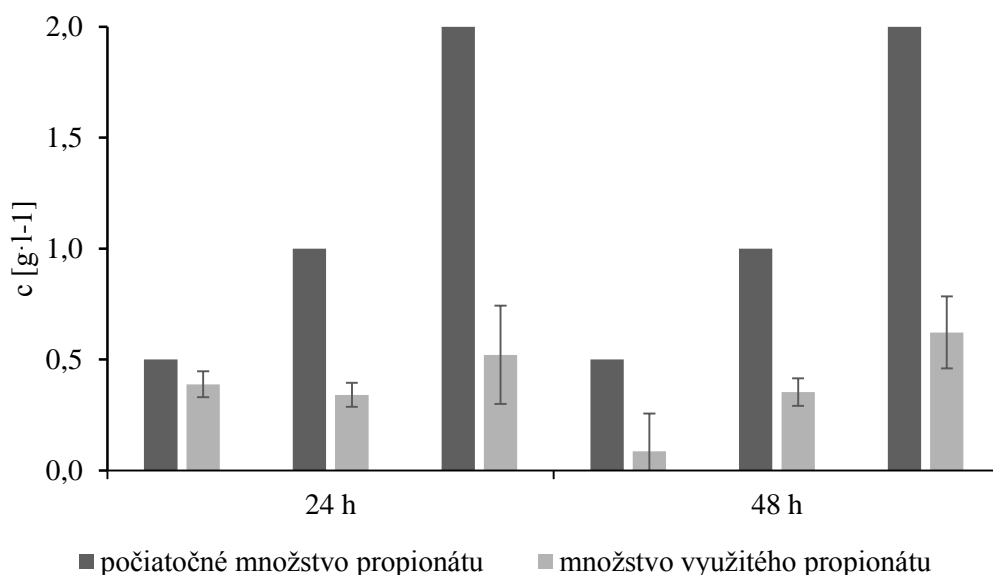
Tabuľka 15: Koncentrácie zistených organických kyselín po ukončení kultivácie

čas pridania propionátu [h]	konc. propionát [g·l ⁻¹]	k. octová [g·l ⁻¹]	k. propiónová [g·l ⁻¹]
24	0,5	0,043 ± 0,012	0,112 ± 0,058
	1,0	0,201 ± 0,016	0,659 ± 0,055
	2,0	0,257 ± 0,019	1,479 ± 0,222
48	0,5	0,069 ± 0,033	0,413 ± 0,171
	1,0	0,079 ± 0,012	0,646 ± 0,062
	2,0	0,114 ± 0,008	1,378 ± 0,162

Graf 5: množstvo počiatočnej a využitej glukózy
(pod stĺpcami sú vyznačené koncentrácie propionátu v $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)



Graf 6: Znáznornenie počiatočného a využitého množstva propionátu



Vyššie koncentrácie biomasy boli dosiahnuté v prípadoch neskoršieho pridania prekurzoru do kultivačných médií, teda až po 48 hodinách. Znamená to, že toxický efekt prekurzorov je výrazne nižší u už narastenej bakteriálnej kultúry. V kultivácii s propionátom pridaným po 24 hodinách bol zaznamenaný najvyšší nárast biomasy pri koncentrácii prekurzoru $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V prípade pridania propionátu po 48 hodinách bola najvyššia koncentrácia biomasy dosiahnutá pri koncentrácii propionátu $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Z hľadiska nárastu biomasy sa táto možnosť javí ako najvýhodnejšia.

Celkový obsah PHA v sušine bol najvyšší (49,02 %) pri kultiváciách baktérie s propionátom pridaným až po 48 hodinách, a to pri koncentrácii $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri sledovaní inkorporácie monoméru 3HV do polymérneho reťazca bolo zistené, že najvyšší podiel 3HV (11,82 %) bol

dosiahnutý pridaním 0,5% propionátu po 24. hodine kultivácie. Aj výťažnostný koeficient $Y_{3HV/prek}$ je v tomto prípade výrazne vyšší od ostatných.

Všeobecne možno povedať, že z hľadiska syntézy kopolyméru P(3HB-co-3HV) sa ako najlepší javí prídavok nižšej dávky prekursoru ($0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) po 24. hodine kultivácie. Vyššia dávka prekursoru prekvapivo skôr znižuje zastúpenie 3HV v kopolyméri. Neskorší prídavok prekursoru síce čiastočne navýši výťažok PHA i biomasy, obsah 3HV je však aj tak výrazne nižší.

4.4 Štúdium produkcie PHA z kukuričného odpadu

V nasledujúcich kapitolách sú popísané experimenty zaoberajúce sa štúdiom produkcie PHA z odpadného substrátu. Použitým odpadným substrátom bola kukuričná siláž, v ktorej bol najprv stanovený obsah celulózy. Ďalej bol experimentálne určený najvhodnejší spôsob hydrolýzy materiálu na cukry využiteľné baktériami. Na pripravených hydrolyzátach boli kultivované baktérie *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia*, pričom bola sledovaná produkcia PHA.

4.4.1 Stanovenie celulózy

Obsah celulózy bol zisťovaný v dvoch vzorkách kukuričnej biomasy. Prvou skúmanou vzorkou boli listy, druhou stonky listov kukurice.

Tabuľka 16: Stanovenie celulózy vo vzorkách kukuričnej siláže

vzorka	obsah celulózy [%]
listy	$30,81 \pm 1,06$
stonky	$35,64 \pm 2,18$

Vyšší obsah celulózy bol zistený v kukuričných stonkách, ktoré obsahovali $35,64 \pm 2,18$ % celulózy. Kukuričné listy obsahovali o 4,82 % celulózy menej, a to 30,81 %.

4.4.2 Štúdium vplyvu typu hydrolýzy kukuričnej siláže na produkciu PHA

Aby baktérie mohli využívať kukuričnú siláž ako odpadný substrát, musia byť stavebné polysacharidy hydrolyticky rozštiepené na stráviteľné cukry. V uvedenom experimente bola hydrolýza uskutočňovaná enzymaticky, pôsobením celulózy (hydrolyzát A), chemickým spôsobom – 30 minútovým varom v 1% kyseline sírovej pri 120 °C (hydrolyzát B) a kombináciou oboch ciest, pričom kukuričná siláž bola najprv vystavená pôsobeniu 1% kyseliny sírovej (30 minútový var pri 120 °C) a po vychladení a úprave pH na hodnotu približne 4,5 bol pridaný enzým celulóza.

4.4.2.1 Príprava hydrolyzátov



Obrázok 13: Pripravené hydrolyzáty a zvyšky z filtrácie

Tabuľka 17: Koncentrácia glukózy v hydrolyzátoch A, B a C

hydrolyzát	koncentrácia redukujúcich cukrov [g·l ⁻¹]
A	1,568 ± 0,115
B	13,498 ± 0,645
C	22,847 ± 0,908

Hydrolýza pôsobením samotného enzýmu celulózy (Obrázok 13, A) bola najmenej efektívna. Filtrát obsahoval $1,568 \pm 0,115 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy, vzhľadom k ostatným bol pomerne číry a filtračný zvyšok tvorili najmenej porušené zvyšky kukuričného materiálu. Pri hydrolýze zriedenou kyselinou sírovou (Obrázok 13, B) bol dosiahnutý vyšší obsah glukózy, $13,498 \pm 0,645 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri kombinácii uvedených metód hydrolýzy (Obrázok 13, C). Týmto spôsobom bolo získaných $22,847 \pm 0,908 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy.

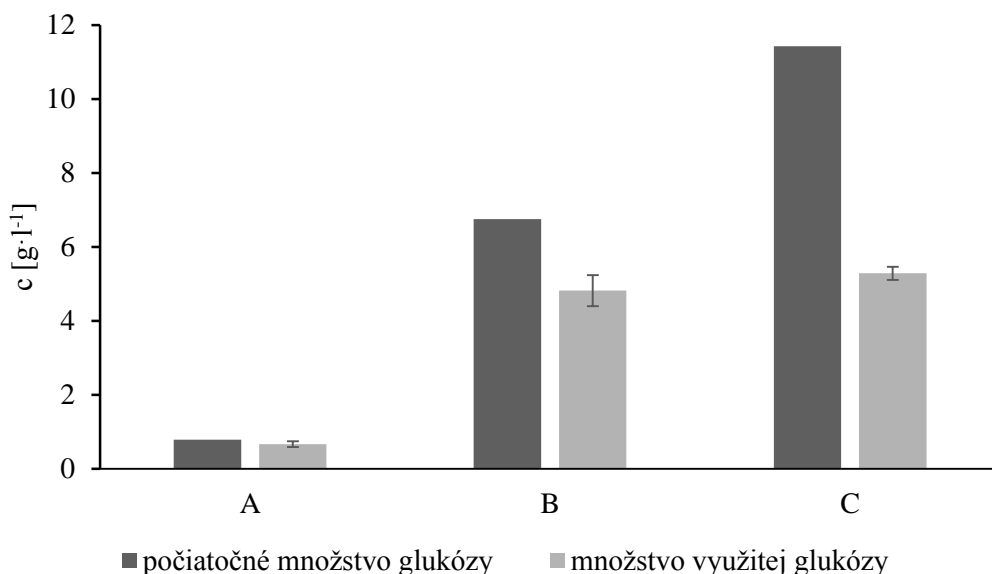
4.4.2.2 Kultivácia baktérií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* na hydrolyzáte

Kultivácia baktérii prebiehala na hydrolyzátoch kukuričnej siláže.

Tabuľka 18: Obsah PHA v sušine baktérie *Burkholderia sacchari*

hydrolyzát	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	Y _{P/S} [-]
A	1,83 ± 0,04	1,24 ± 0,18	15,70 ± 0,13	1,858 ± 0,267
B	3,54 ± 0,12	2,03 ± 0,09	31,58 ± 1,28	0,421 ± 0,019
C	3,35 ± 0,33	3,08 ± 0,99	49,03 ± 5,24	0,583 ± 0,187

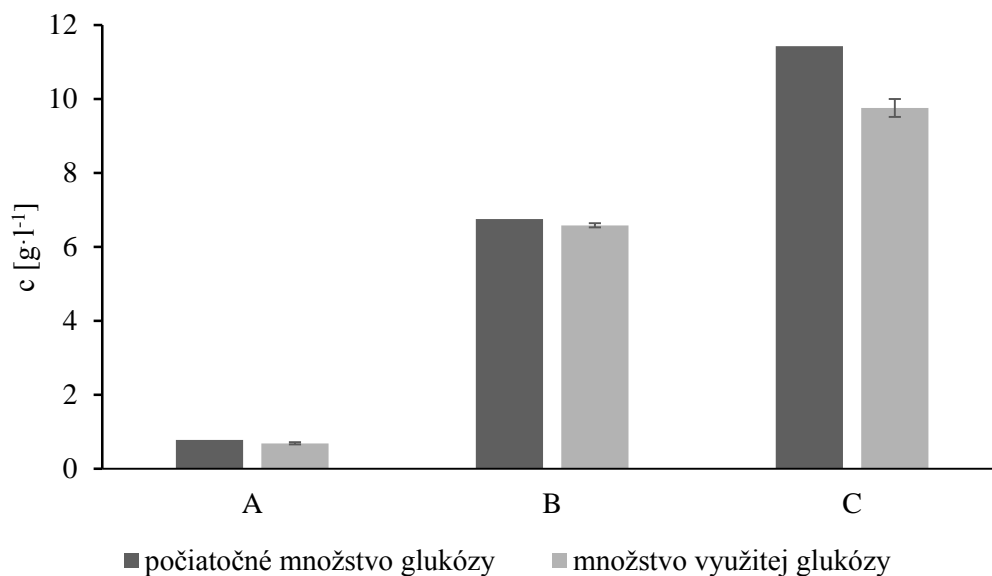
Graf 7: Množstvo počiatočnej a využitej glukózy pri kultivácii baktérie *Burkholderia sacchari* na hydrolyzátach A, B a C



Tabuľka 19: Obsah PHA v sušine baktérie *Burkholderia cepacia*

hydrolyzát	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	Y _{P/S} [-]
A	2,02 ± 0,04	0,62 ± 0,12	9,01 ± 1,16	-	0,900 ± 0,175
B	3,82 ± 0,10	1,79 ± 0,13	20,71 ± 2,74	-	0,272 ± 0,020
C	5,31 ± 0,44	4,92 ± 0,39	47,81 ± 2,90	2,56 ± 0,31	0,505 ± 0,040

Graf 8: Množstvo počiatočnej a využitej glukózy pri kultivácii baktérie *Burkholderia cepacia* na hydrolyzátach A, B a C



Pri kultivácii baktérie *Burkholderia sacchari* na hydrolyzátach kukuričnej siláže bol najvyšší obsah biomasy dosiahnutý s použitím hydrolyzátu B, pripraveného pôsobením zriedenej

kyseliny sírovej. Najviac PHA v sušine ($49,03 \pm 5,24 \%$), však obsahovali bunky baktérii kultivovaných na hydrolyzáte C, ktorý vznikol kombinovanou metódou.

Najlepšie výsledky z hľadiska nárastu biomasy, aj podielu PHA v sušine pri kultivácii baktérie *Burkholderia cepacia* vykazoval hydrolyzáte C, pripravený kombinovanou metódou. Tento výsledok bol očakávaný, keďže v tomto hydrolyzáte bolo zistené najvyššie množstvo redukujúcich cukrov. V tejto kultivácii bola navyše zistená prítomnosť 3HV v sušine biomasy, a to vo vzorke C. Je možné, že prekursorom pre syntézu 3HV bol niektorý z produktov kyslej hydrolýzy, napríklad kyselina levulinová, ktorá vzniká degradáciou hexózu [34].

Čo sa týka koeficientov výťažnosti pre produkciu PHA zo substrátu $Y_{P/S}$, bolo zistené, že najvyššie hodnoty dosahuje pri kultiváciách na enzymatickom hydrolyzáte (hydrolyzáte A). Aj napriek relatívne nízkemu počiatočnému obsahu sacharidov v hydrolyzátoch boli obe kultúry, aj tieto vzorky využité k rastu a produkcii PHA. Je možné, že pri kultivácii boli utilizované aj ďalšie komponenty biomasy, ktoré sa z kukuričnej siláže uvoľnili v priebehu hydrolýzy (proteíny, fenolické látky, atď.). V tomto kontexte môže byť hodnota výťažnostného koeficientu, v ktorej sú ako jediný substrát uvažované sacharidy, čiastočne nekorektná. Celkovo boli najvyššie výťažky biomasy i PHA u oboch baktérii dosiahnuté pri hydrolyzáte C, ako ideálna predúprava substrátu sa teda javí kombinácia chemickej a enzymatickej hydrolýzy.

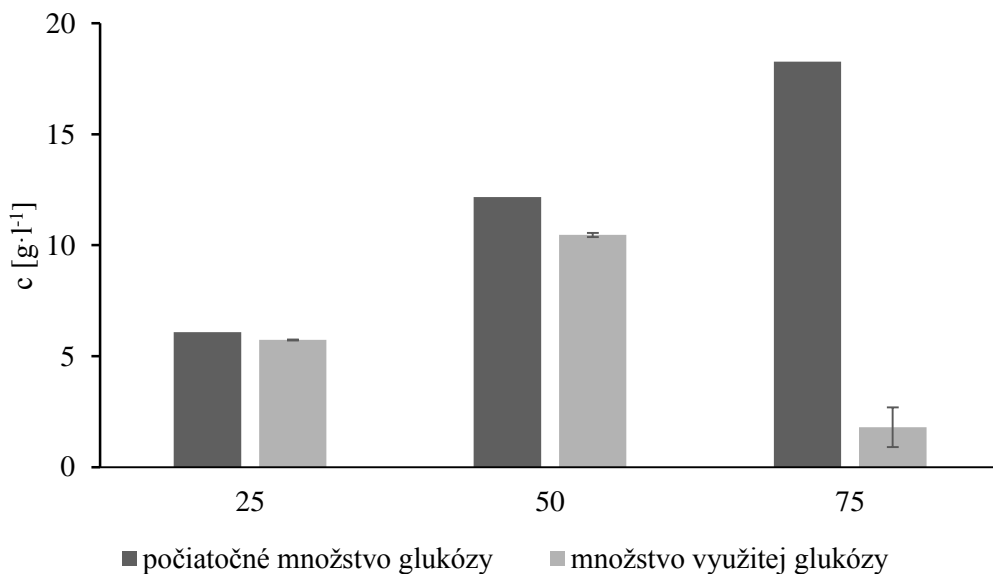
4.4.3 Štúdium vplyvu koncentrácie hydrolyzátu na produkciu PHA

V tomto experimente bol na kultiváciu baktérii *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* použitý hydrolyzáte kukuričnej siláže pripravený kombináciou hydrolýzy 1% kyselinou sírovou a enzýmom celulázou. Skúmaným faktorom ovplyvňujúcim produkciu PHA bol pomer hydrolyzátu a minerálneho kultivačného média.

Tabuľka 20: Obsah PHA v sušine baktérie *Burkholderia sacchari*

pomer hydrolyzáte : médium	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	$Y_{P/S}$ [-]
25 : 75	$2,47 \pm 0,02$	$3,33 \pm 0,20$	$31,82 \pm 1,11$	-	$0,580 \pm 0,034$
50 : 50	$4,31 \pm 0,16$	$4,24 \pm 0,44$	$38,28 \pm 3,48$	$1,18 \pm 1,20$	$0,405 \pm 0,042$
75 : 25	$0,97 \pm 0,62$	$0,70 \pm 0,02$	$15,09 \pm 7,44$	-	$0,391 \pm 0,009$

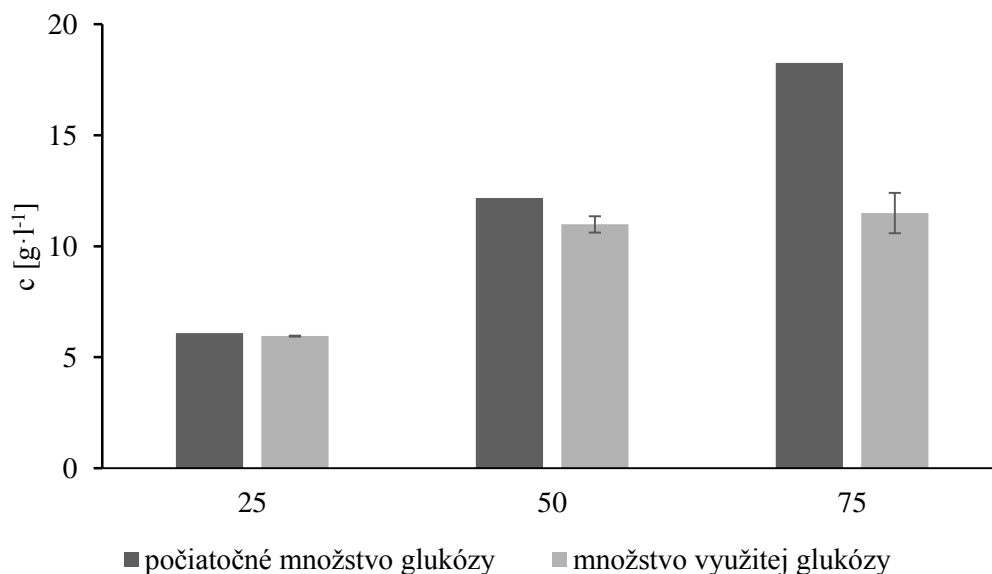
Graf 9: Množstvo počiatočnej a využitej glukózy pri kultivácii baktérie *Burkholderia sacchari* (pod stĺpcami je vyznačený objem hydrolyzátu v 100 ml média)



Tabuľka 21: Obsah PHA v sušine baktérie *Burkholderia cepacia*

pomer hydrolyzát : médium	koncentrácia biomasy [g·l ⁻¹]	koncentrácia PHA [g·l ⁻¹]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	Y _{P/S} [-]
25 : 75	3,02 ± 0,22	1,32 ± 0,03	12,22 ± 0,45	1,78 ± 3,08	0,222 ± 0,006
50 : 50	4,83 ± 0,27	3,05 ± 0,19	29,21 ± 2,23	3,98 ± 0,12	0,278 ± 0,017
75 : 25	5,27 ± 0,21	3,34 ± 0,25	30,17 ± 1,31	4,35 ± 0,43	0,291 ± 0,022

Graf 10: Množstvo počiatočnej a využitej glukózy pri kultivácii baktérie *Burkholderia cepacia* (pod stĺpcami je vyznačený objem hydrolyzátu v 100 ml média)



Pri kultivácii v médiách s rôznymi koncentraciami hydrolyzátu boli u baktérie *Burkholderia sacchari* dosiahnuté najlepšie výsledky z hľadiska nárastu biomasy aj produkcie PHA pri

pomere hydrolyzát : minerálne médium 50 : 50. Pri tejto kultivácii bola zároveň dosiahnutá najvyššia hodnota koeficientu výťažnosti PHA zo substrátu a bolo zaznamenané aj určité množstvo monoméru 3HV. Pri použití nižšieho podielu hydrolyzáta bola bakteriálna kultúra pravdepodobne limitovaná zdrojom uhlíka. Pri vyššej koncentrácii hydrolyzáta je zas zrejma inhibícia bakteriálnej kultúry, ktorá je pravdepodobne spôsobená niektorými komponentami nachádzajúcimi sa v hydrolyzáte (polyfenoly, furfural a jeho deriváty, organické kyseliny, atď.).

Najlepšie podmienky pre nárast biomasy a tvorbu PHA baktérie *Burkholderia cepacia* boli vytvorené zmiešaním hydrolyzáta s minerálnym médiom v pomere 75 : 25. Na rozdiel od baktérie *Burkholderia sacchari* nebola u tejto baktérie pozorovaná inhibícia vyššou dávkou hydrolyzáta. Zdá sa teda, že baktéria *Burkholderia cepacia* je voči mikrobiálnym inhibítorm prítomným v hydrolyzáte kukuričnej siláže rezistentná. Pri tomto pomere bola zistená najvyššia hodnota výťažnostného koeficientu $Y_{P/S}$ a najväčší obsah PHA v sušine: $30,17 \pm 1,31$ %. Výsledky dosiahnuté pri pomere 50 : 50 sa ale veľmi nelíšili ($29,21 \pm 2,23$ % PHA v sušine). Navyše pri všetkých kultiváciách vznikol aj monomér 3HV, najväčší podiel pri pomere hydrolyzát : médium 75 : 25.

4.4.4 Kultivácia baktérie *Burkholderia cepacia* na hydrolyzáte kukuričnej siláže v laboratórnom bioreaktore

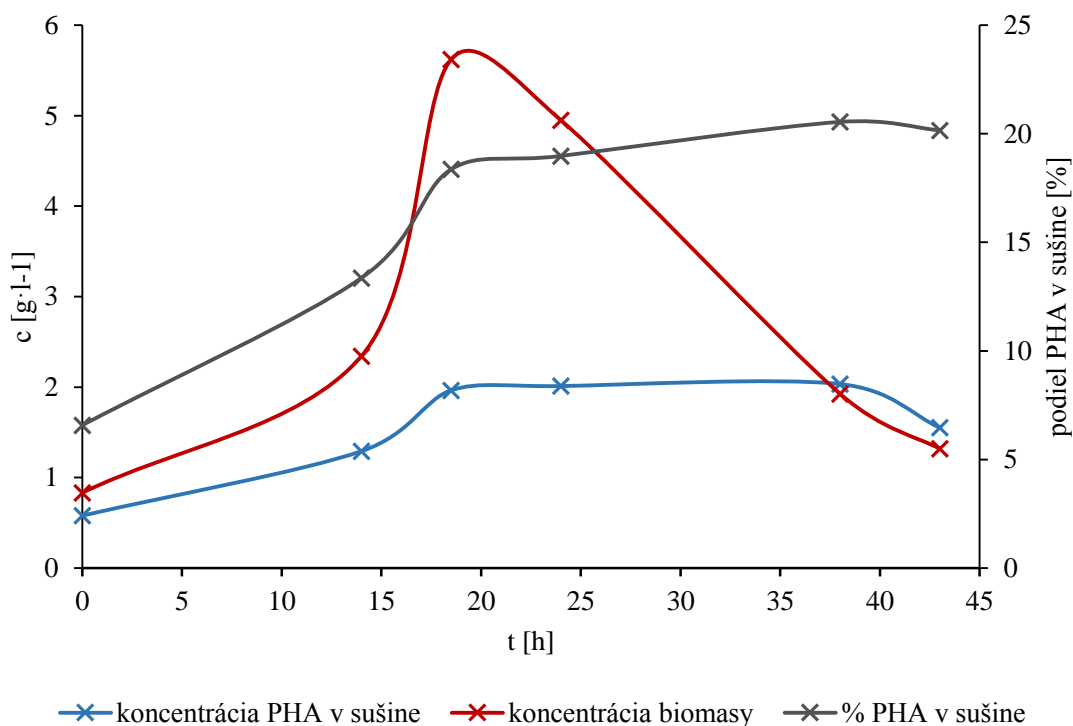
Baktéria *Burkholderia cepacia* bola kultivovaná na hydrolyzáte kukuričnej siláže. Hydrolyzát tvoril 60 % objemu vsádzky. Kultivácia prebiehala vo fermentore po dobu 43 hodín. Počas tejto doby bolo odobraných celkom 6 vzoriek obsahu fermentoru, v časoch 0; 14; 18,5; 24; 38 a 43 hodín kultivácie. Vo vzorkách bola sledovaná koncentrácia biomasy a produkcia PHA.



Obrázok 14: Kultivácia baktérie *Burkholderia cepacia* v laboratórnom bioreaktore na hydrolyzáte kukuričnej siláže

Tabuľka 22: Obsah PHA v sušine

čas odobrania vzorky [h]	koncentrácia biomasy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	koncentrácia PHA [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	obsah PHA v sušine [%]	podiel 3HV [%]	koncentrácia zvyškových cukrov [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	$Y_{P/S}$ [-]
0	$0,83 \pm 0,04$	0,58	6,58	-	$13,14 \pm 0,39$	-
14	$2,34 \pm 0,02$	1,29	13,36	2,87	$8,95 \pm 0,09$	0,225
18,5	$5,62 \pm 0,09$	1,97	18,36	3,00	$7,82 \pm 0,15$	0,369
24	$4,95 \pm 0,43$	2,01	18,98	-	$6,05 \pm 0,15$	0,232
38	$1,93 \pm 0,10$	2,03	20,55	-	$4,74 \pm 0,12$	0,242
43	$1,32 \pm 0,05$	1,55	20,16	-	$4,78 \pm 0,36$	0,186

Graf 11: Priebeh kultivácie baktérie *Burkholderia cepacia* v laboratórnom bioreaktore

Baktéria *Burkholderia cepacia* bola otestovaná aj v rámci pilotného experimentu v laboratórnom reaktore. Laboratórny bioreaktor umožňuje na rozdiel od kultivácie v bankách reguláciu niektorých zásadných veličín, ako je pH a koncentrácia rozpusteného kyslíka. V priebehu kultivácie bolo pH regulované na hodnote 7 a koncentrácia rozpusteného kyslíka na hodnote 30 %. V rámci kultivácie bol zvolený základný kultivačný vsádkový režim, kedy ako jediný zdroj uhlíka bol využívaný hydrolyzáť kukuričnej siláže pripravený kombináciou chemickej a enzymatickej hydrolýzy. Bakteriálna kultúra bola schopná substrát efektívne utilizovať a aj napriek technickým problémom s prevzdušňovaním bola po 18,5 hodinách kultivácie dosiahnutá relatívne solídna koncentrácia biomasy – $5,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Obsah PHA bol však relatívne nízky – 18,4 %. V ďalšom priebehu kultivácie začala koncentrácia biomasy v reaktore dramaticky klesať, po 48. hodine kultivácie bolo v reaktore len $1,32 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ biomasy. Tento trend naznačuje, že bunky bolo v neskoršej fáze kultivácie vystavené silne stresovému prostrediu

(možná je limitácia uhlíkovým zdrojom, prípadne negatívny vplyv látok použitých k regulácii pH), čo viedlo k lýze buniek a znehodnoteniu výťažku. Pre dosiahnutie lepších výťažkov a overenie realizovateľnosti priemyselnej produkcie PHA s využitím hydrolyzáta kukuričnej siláže by bolo vhodné kultiváciu zopakovať a prípadne overiť kultivačnú stratégiu fed-batch, ktorá by mala zabrániť limitácii zdrojom uhlíka.

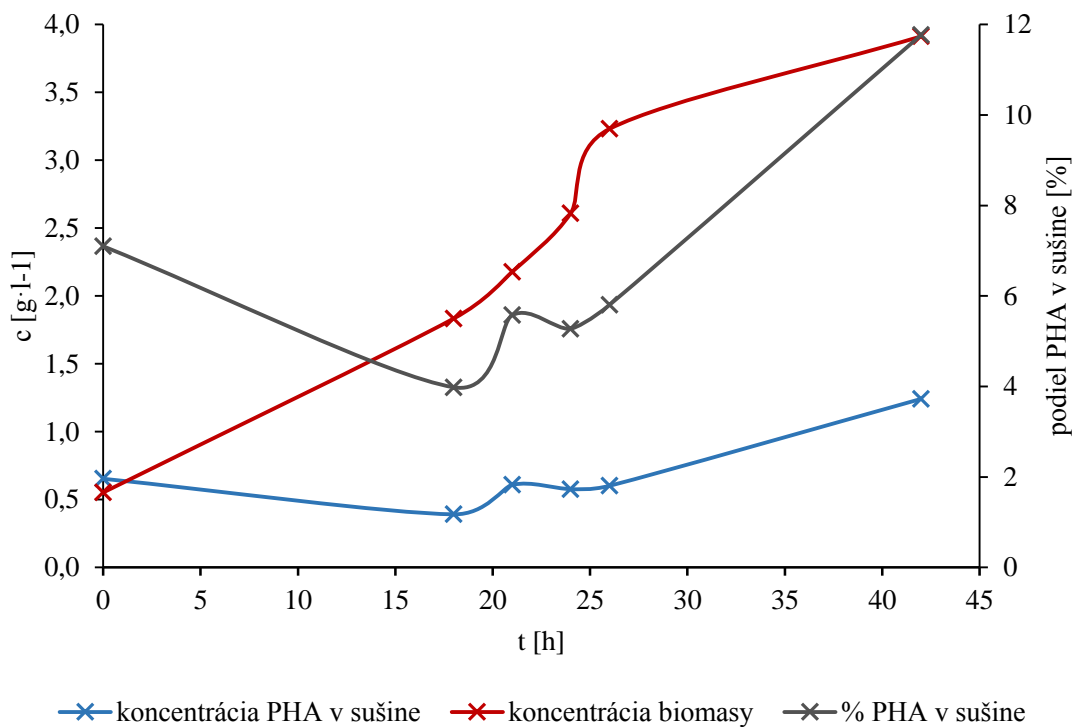
4.4.5 Kultivácia baktérie *Burkholderia sacchari* na hydrolyzáte kukuričnej siláže v laboratórnom bioreaktore

Baktéria *Burkholderia sacchari* bola kultivovaná na hydrolyzáte kukuričnej siláže, pričom kultivácia prebiehala za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcom experimente. Doba kultivácie bola 42 hodín a vzorky boli odobrané v časoch 0, 18, 21, 24, 26 a 42 hodín.

Tabuľka 23: Obsah PHA v sušine

čas odobrania vzorky [h]	koncentrácia biomasy $[g \cdot l^{-1}]$	koncentrácia PHB $[g \cdot l^{-1}]$	obsah PHB v sušine [%]	koncentrácia zvyškových cukrov $[g \cdot l^{-1}]$	$Y_{P/S}$ [-]
0	$0,552 \pm 0,013$	$0,65 \pm 0,00$	$7,10 \pm 0,00$	$13,45 \pm 0,11$	-
18	$0,536 \pm 0,027$	$0,39 \pm 0,02$	$3,98 \pm 0,72$	$12,30 \pm 0,02$	$0,176 \pm 0,145$
21	$1,834 \pm 0,068$	$0,61 \pm 0,13$	$5,58 \pm 0,99$	$11,56 \pm 0,02$	$0,212 \pm 0,176$
24	$2,178 \pm 0,070$	$0,58 \pm 0,08$	$5,28 \pm 0,56$	$9,80 \pm 0,22$	$0,158 \pm 0,022$
26	$2,608 \pm 0,017$	$0,60 \pm 0,04$	$5,80 \pm 0,09$	$8,56 \pm 0,65$	$0,123 \pm 0,008$
42	$3,231 \pm 0,022$	$1,24 \pm 0,30$	$11,77 \pm 2,39$	$1,77 \pm 0,02$	$0,106 \pm 0,026$

Graf 12: Priebeh kultivácie baktérie *Burkholderia sacchari* v laboratórnom bioreaktore



Baktéria *Burkholderia sacchari* bola taktiež otestovaná v laboratórnom bioreaktore. Schéma kultivácie bola prakticky totožná so schémou použitou pre kultiváciu baktérie *Burkholderia cepacia*. Experimentom bolo overené, že aj baktéria *Burkholderia sacchari* je schopná utilizovať použitý substrát, avšak dynamika kultivácie bola veľmi nízka. Výťažky biomasy a PHA sú taktiež veľmi nízke. Pravdepodobne sa prejavila relatívne nízka rezistencia bakteriálnej kultúry voči mikrobiálnym inhibítorom prítomným v hydrolyzáte kukuričnej siláže. Z tohto dôvodu sa zdá, že baktéria *Burkholderia sacchari* nie je vhodným produkčným kmeňom pre tvorbu PHA na testovanom substráte.

5 ZÁVER

Práca bola zameraná na štúdium produkcie polyhydroxyalkanoátov baktériami *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* a taktiež faktorov, ktoré produkciu ovplyvňujú. Tvorba PHA bola sledovaná aj na lignocelulózovom odpadnom substráte – kukuričnej siláži.

V teoretickej časti bola podaná stručná charakteristika polyhydroxyalkanoátov a ich najvýznamnejšieho zástupcu – polyhydroxybutyrátu. Ďalej boli zhrnuté fyzikálno-chemické vlastnosti PHA a opísaný proces biosyntézy a biodegradácie, ako aj možnosti ich využitia v praxi ako biodegradabilných plastov. Taktiež boli spomenuté možné cesty k zníženiu produkčných nákladov a opísané možnosti bakteriálnej produkcie PHA prostredníctvom kultivácie na odpadných substrátoch. Niekoľko kapitol bolo venovaných aj vlastnostiam lignocelulózových materiálov a spôsobom ich hydrolýzy na cukry stráviteľné baktériami.

V experimentálnej časti práce bol sledovaný vplyv použitých prekursorov, ako aj ich koncentrácie a čase pridania do kultivačného média na nárast biomasy kultúry, produkciu PHA a inkorporáciu monoméru 3HV do polyméru. Ako najvýnosnejší z hľadiska nárastu biomasy sa pri baktérii *Burkholderia cepacia* ukázal propionát, ktorého prídavok zároveň vyvolal najvyšší podiel 3HV v polyméri. Najvyššia akumulácia PHA bola dosiahnutá s valerátom. Baktéria *Burkholderia sacchari* dosahovala najvyššiu koncentráciu biomasy a najväčší podiel PHA v sušine pri prídavku levulinátu, najvyšší podiel 3HV s použitím valerátu a propionátu.

Pri štúdiu vplyvu koncentrácie a času pridania prekursoru do média, lepšie výsledky boli z hľadiska nárastu biomasy a podielu PHA v sušine dosiahnuté v prípadoch pridania propionátu až po 48 hodinách kultivácie. Čo sa týka koncentrácie prekursoru, väčší nárast biomasy a taktiež vyšší podiel PHA v sušine vykazovala kultivácia s najnižšou koncentráciou – $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre tvorbu kopolyméru P(3HB-co-3HV) je najvýhodnejší prídavok prekursoru v koncentrácii $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 hodinách kultivácie.

Tvorba PHA bola skúmaná aj kultiváciou na odpadnom substráte. Ako odpadný substrát bola použitá kukuričná siláž. V tomto rastlinnom materiáli bol stanovený obsah celulózy a následne bol podrobený hydrolýze tromi spôsobmi – enzymatickým, chemickým a kombináciou oboch spôsobov. Najviac využiteľných cukrov bolo zistených v hydrolyzáte pripravenom kombináciou chemickej a enzymatickej hydrolýzy. Táto cesta sa ukázala ako najvhodnejší spôsob predúpravy kukuričnej siláže aj čo sa týka kultivácie baktérii a produkcie PHA.

Pri sledovaní vplyvu koncentrácie hydrolyzátu pridávaného do kultivačného média bolo zistené, že baktérii *Burkholderia sacchari* najviac vyhovuje zmiešanie hydrolyzátu s produkčným médiom v pomere 50 : 50, zatiaľ čo baktéria *Burkholderia cepacia* dosahovala najlepšie výsledky pri pomere hydrolyzát : minerálne médium 75 : 25.

Obe baktérie boli na hydrolyzáte kukuričnej siláže kultivované aj v laboratórnom bioreaktore. Baktéria *Burkholderia cepacia* bola schopná úspešne utilizovať zvolený substrát a dosiahla koncentráciu biomasy $5,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, po určitom čase však biomasa začala prudko klesať a aj výťažok PHA bol pomerne nízky. Riešením by mohla byť kultivácia metódou fed-batch, kedy by sa predišlo limitácii uhlíkovým zdrojom. Druhá skúmaná baktéria, *Burkholderia sacchari* sa na zvolenom substráte veľmi neosvedčila, výťažky biomasy aj PHA boli pomerne nízke a celá kultivácia sa vyznačovala nízkou dynamikou.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y.: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 2000, **25**(10): 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700.
2. LOO, C.-Y., SUDESH, K.: Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2007, vol. 2, no. 2, p 31-57.
3. CHEN, G.-Q.: Plastics from bacteria: natural functions and applications. *Microbiology monographs*, 2010, New York: Springer, vol. 14, no. 1. DOI: 10.1007/978-3-642-03287_5_2. ISBN 3642032869.
4. STEINBÜCHEL, A., FÜCHTENBUSCH, B.: Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**(10): 419-427. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01194-9. ISSN 01677799.
5. CESÁRIO, M. T., RAPOSO, R. S., de ALMEIDA, M. C. M. D., and co.: Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, vol. 71, no. 1, p. 59-67. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054
6. WANG, Y., YIN, J., CHEN, G.: Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, vol. 30, issue 1, p. 59-65. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.001.
7. PHILIP, S., KESHAVARZ, T., ROY, I.: Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, vol. 82, p. 233-247. ISSN 0268-2575.
8. KESHAVARZ, T., ROY, I.: Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology*, 2010, 13(3), ISSN 321-326.
9. FLICKINGER, M. C., DREW, S. W.: *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, 1999, 5 v. (xvii, 2756 p.). ISBN 04711666851.
10. SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D. and co.: Biosynthesis of Medium-chain-length Poly(hydroxyalkanoates) from Soy Molasses. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(3), p. 157-162. DOI: 10.1007/s10529-005-5329-2. ISSN 0141-5492.
11. BHATI, R., MALLICK, N.: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. *Algal Research*, 2015, roč. 2015, č. 7, s. 78-85. DOI: 10.1016/j.algal.2014.12.003.
12. ROCHA, R. C. S., DA SILVA, L. F. and co.: Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 24, issue 3, p. 427-431. DOI: 10.1007/s11274-007-9480-x.
13. SHIRAKURA, Y., FUKUI, T. and co.: Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 880(1), p. 46-53.
14. DOI, Y., MUKAI, K. and co.: Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates. *Biodegradable plastics and polymers*, Amsterdam: Elsevier, 1994, p. 39-51.

15. IVANOV, V., STABNIKOV, V. and co.: Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2015, vol. 12, issue 2, p. 725-738. DOI: 10.1007/s13762-014-0505-3.
16. RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M. and co.: Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, vol. 94, no. 1, p. 50-57. DOI: 10.1016/j.bej.2014.11.007.
17. PAULOVÁ, L., PAVLOVÁ, E., OLŠAN, V.: Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. *CHEMAGAZÍN*, 2010 (5). ISSN 1210-7409
18. OLVER, B., VAN DYK, J. S. and co.: Synergy between EngE, XynA and ManA from *Clostridium cellulovorans* on corn stalk, grass and pineapple pulp substrates. *3 Biotech*, 2011, vol. 1, issue 4, p. 187-192. DOI: 10.1007/s13205-011-0011-y.
19. Lignocellulosic Biomass. 2014. In: *Michigan Technological University* [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://www.sfi.mtu.edu/FutureFuelfromForest/LignocellulosicBiomass.htm>
20. REDA, C., ZIMBARDI, F. and co.: Mathematical Tool from Corn Stover TGA to Determine Its Composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, vol. 167, issue 8, p. 2283-2294. DOI: 10.1007/s12010-012-9756-y.
21. Cellulose. 2013. In: *Marcos Internetaufritt* [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://ms.zneb.at/html/chemieklasse12/cellulose/cellulose.htm>
22. HENDRICKS A. T., ZEEMAN, G.: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2009, vol. 100, p. 10–18.
23. SÁNCHEZ C.: Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 2009, 27 (2), p. 185–194.
24. ESTELA, R., LUIS, J.: Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, 2013, InTech, (no. 1). DOI: 10.5772/53719. ISBN 978-953-51-1119-1.
25. SUN, N., XU, F. and co.: Blending municipal solid waste with corn stover for sugar production using ionic liquid process. *Bioresource Technology*, 2015, vol. 186, no. 1, p. 200-206. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.087.
26. Dussan, K. J., Silva, D. D. V. and co.: Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse, *Chemical Engineering Transactions*, 2014, vol. 38, p. 433-438. DOI: 10.3303/CET1438073.
27. YANG, B., DAI, Z. and co.: Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2011, vol. 2, issue 4, p. 421-450. DOI: 10.4155/bfs.11.116.
28. WANG, N. S. 2009. Cellulose degradation. *University of Maryland* [online]. (1) [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4.htm>
29. ALLARDYCE, B. J., LINTON, S. M., SABOROWSKI .: The last piece in the cellulase puzzle: the characterisation of -glucosidase from the herbivorous gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis*. *Journal of Experimental Biology*, 2010, **213**(17): 2950-2957. DOI: 10.1242/jeb.041582.

30. PAN, W., PERROTTA, J. A. and co.: Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology*, 2012, vol. 39, issue 3, p. 459-469. DOI: 10.1007/s10295-011-1040-6.
31. Scanning Electron Micrograph of *Burkholderia cepacia*. 2005. In: *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
32. RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M. and co.: Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, vol. 94, no. 1, p. 50-57. DOI: 10.1016/j.bej.2014.11.007.
33. MENDONÇA, T.T., GOMEZ, J.G.C. and co.: Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, **116**(4): 815-829. DOI: 10.1111/jam.12406. ISSN 13645072.
34. OBRUCA, S., BENESOVA, P., PETRIK, S., OBORNA, J., PRIKRYL, R., MAROVA, I.: Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*, 2014, **49**(9): 1409-1414. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.05.013. ISSN 13595113.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(4HV)	poly(4-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)
PP	polypropylén
3HHx	3-hydroxyhexanoát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
scl PHA	short-chain-length polyhydroxyalkanoáty
mcl PHA	medium-chain-length polyhydroxyalkanoáty